PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
FACULTAD DE AGRONOMIA Y SISTEMAS NATURALES
DIRECCION DE POSTGRADO
MAGISTER EN FISIOLOGÍA Y PRODUCCIÓN VEGETAL

CARACTERIZACIÓN DE DORMANCIA, MORFOLOGÍA Y PRESENCIA DE HONGOS ENDÓFITOS EN SEMILLAS DE *Morella pavonis* (C.DC.) Parra-Os.

Tesis presentada como requisito para optar al grado de

Magister en Fisiología y Producción Vegetal

por:

Allison Camila Uvidia Calles

Comité de Tesis
Profesor Guía: Samuel Contreras Escobar
Profesor Co-Guía: Pedro León Lobos
Profesores Informantes:
Miguel Gómez Ungidos
Priscila Moraga Suazo

Enero 2024
Santiago-Chile

Agradecimientos

Al profesor Samuel Contreras ya que su paciencia y don de enseñanza me incursionó el interés en un nuevo mundo del cual desconocía “las semillas”, al INIA por la proporción del material vegetal, al profesor Pedro León por la entereza y sapiencia para la creación de los diseños experimentales importantes para el levantamiento de información.

Al profesor Miguel Gómez ya que su pasión por la Botánica nos llevó a indagar mucho más allá de lo que abarcaba este estudio, a la profesora Priscila Moraga por confiar en mi experiencia y aunque aún me considero aprendiz, en todo momento hubo concordancia para la recepción de mis ideas. A Ana Fernández por ser una gran mentora en el amplio mundo de la ciencia, pero sobre todo una gran amiga.

A mis padres, a mis hermanas y a Chile.

A Mery, Lito, Pedrito, Hugo y Bruno

Índice

Índice 4
Abstract 6
Introducción 7
Materiales y métodos 11
Material Vegetal 11
Caracterización morfológica de los frutos 12
Análisis histológico 12
Caracterización de la imbibición de las semillas 12
Ensayo de viabilidad 12
Evaluación de respuesta al secado 13
Contenido de humedad en semillas de *M. pavonis* 13
Efecto de la desecación en la viabilidad de la semilla 13
Evaluación de la capacidad germinativa 13
Efecto de la estratificación 14
Uso de ácido giberélico 14
Efecto de la escarificación 15
Efecto de tratamientos combinados 15
Tratamientos para evaluar temperaturas alternantes 15
Diseño experimental 16
Análisis estadístico de la germinación 16
Aislamiento de hongos endófitos en semillas de *M. pavonis* 16
Caracterización cultural y morfológica de hongos endófitos 16
Análisis estadístico- hongos endófitos 17
Resultados 18
Morfología del fruto de *Morella pavonis* 18
Análisis histológico 18
Caracterización de la Imbibición 20

Ensayo de viabilidad 20
Evaluación de respuesta al secado 21
Efecto de la estratificación 23
Uso de GA3 24
Efecto de la escarificación..... 25
Efectos de tratamientos combinados..... 26
Efecto de las temperaturas alternantes 27
Aislamiento de hongos endófitos en semillas de *Morella pavonis* 27
Abundancia Relativa de morfotipos 27
Análisis de la diversidad alfa de morfotipos..... 28
Características macroscópicas y microscópicas de hongos endófitos 28
Discusión..... 34
Conclusiones 42
Resumen..... 43
Referencias..... 44

CHARACTERIZATION OF DORMANCY, MORPHOLOGY AND PRESENCE OF ENDOPHYTIC FUNGI IN SEEDS OF *Morella pavonis* (C.DC.) Parra-Os**.**

Allison Camila Uvidia Calles

Laboratorio de Semillas. Departamento de Ciencias Vegetales, Facultad de Agronomía y Sistemas Naturales. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.

Abstract

Allison Uvidia. Characterization of dormancy, morphology and presence of endophytic fungi in seeds of *Morella pavonis* (C.DC.) Parra-Os. Tesis, *Magister* en Fisiología y Producción Vegetal, Facultad de Agronomía y Sistemas Naturales, Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 49 pp. *Morella pavonis* is a native species distributed in southern Peru and northern Chile, commonly known as pacama, designated in the vulnerable category. There is little information on seed germination and associated endophytic fungi in *M. pavonis*. Generating this knowledge would contribute to developing strategies to help the preservation of this species. Fruits were collected in four locations (Lots) in the provinces of Arica and Tamarugal, the study of the morphology of the fruit indicated that it is composed of a hard endocarp surrounded by wax that does not inhibit the entry of water, inside there is a seed exalbuminated, with a moisture content of 22%, the tetrazolium test showed high viability in all batches (75-88%). The maximum germination was obtained in Lot 4, reaching 87% due to the reduction in moisture content. The second most effective method was the use of GA3 500 ppm, maximizing inefficient germination, raising it from 2% to 78% in Lot 3. Cold stratification at 4 °C increased germination in Lots 1 and 2 with final values of 28 and 33%, respectively, information that suggests the existence of non-deep physiological dormancy.

The seeds of *Morella pavonis* also revealed to harbor endophytic fungi. The presence of 9 morphotypes was found present in Lots 3 and 4, alpha diversity showed higher indices in Lot 4, which corresponds to the one with the lowest level of dormancy.

Keywords: germination, physiological dormancy, morphotypes.

Introducción

Morella pavonis (C.DC.) Parra-Os., es una especie perteneciente a la familia Myricaceae. Arbusto o árbol pequeño nativo de Chile con una altura que oscila los 10-12 m. Entre los nombres vernáculos se pueden encontrar pacama, carza, huacán (Rodríguez & Quezada, 2003), waqan, waqana (Villagrán & Castro, 2004).

Es una especie dioica, su fruto es una drupa globosa de 3,5 mm de diámetro, con una cobertura de papilas cerosas, en su madurez presenta coloración pardo-rojiza; posee endocarpio duro, estriado, pardo-grisáceo, con una única semilla pequeña (Rodríguez et al., 1983). Crece en el centro y sur de Perú y en el norte de Chile entre los 1000 y 3200 msnm (Parra, 2002). En Chile la especie crece en las provincias de Arica e Iquique (18° 50´- 20° 06´ S) entre los 1000 y 2650 msnm (Rodríguez et al., 1983; Rodríguez & Quezada, 2003; Luebert, 2004).

La especie es parte de una vegetación que está fuertemente intervenida y registra pocos antecedentes sobre estructura y composición (Luebert, 2004), encontrándose catalogada entre las especies amenazadas en la categoría de Vulnerable (Benoit, 1989; MMA, 2007). De acuerdo a lo mencionado por Bahamondes et al. (2021), *M. pavonis* brinda distintos servicios ecosistémicos como de provisión, soporte y regulación, este último es el más importante ya que la cobertura arbórea actúa como sombra y reduce las temperaturas extremas.

Actualmente no existe información publicada sobre las condiciones que promueven la germinación de semillas de *M. pavonis*.

Una revisión sobre germinación de *Morella spp.* indica la presencia de dormancia en semillas de especies relacionadas a *M. pavonis*, y para romper dicho estado se requiere de la aplicación de pretratamientos para promover la germinación. Finch-Savage & Leubner Metzger (2006), definen a la dormancia como una característica propia de cada semilla que define las condiciones ambientales que se requiere antes de que la semilla pueda germinar. La dormancia es un carácter genético cuantitativo que involucra muchos genes y presenta variación fenotípica continua (Baskin & Baskin, 2004). Para salir del estado de dormancia, la semilla debe someterse a factores ambientales durante distintos lapsos con el objetivo de inducir cambios en el metabolismo y estructura lo que conllevará a la germinación (Bewley et al., 2013).

De acuerdo con lo mencionado por Baskin & Baskin (1998, 2004), la dormancia de las semillas puede ser: i) fisiológica, con 3 niveles de profundidad (no profunda, intermedia y profunda), ii) morfológica, iii) morfofisiológica, iv) física, y v) combinada (física y fisiológica). El **Cuadro 1** presenta un resumen de las características fundamentales de cada tipo de dormancia.

Cuadro 1. Tipos de dormancia y descripción, según Baskin & Baskin (1998, 2004)

Tipo de dormancia	Descripción
Fisiológica	El embrión posee un mecanismo fisiológico inhibitorio que impide el desarrollo de la radícula. El tratamiento para romper este tipo de dormancia varía de acuerdo al nivel de profundidad. Se han usado distintos tiempos (días o semanas) en estratificación fría o cálida, además también la aplicación exógena de giberelinas.
Morfológica	Las características morfológicas del embrión impiden la germinación. Los embriones están diferenciados, pero aún no han alcanzado su completo desarrollo. La germinación requiere un período en el cual el embrión podrá completar su desarrollo.
Morfofisiológica	Combinación de la dormancia morfológica y fisiológica. Para romper este tipo de dormancia primero se necesita tratar el componente morfológico y posterior la dormancia fisiológica.
Física	Es la impermeabilidad al agua de las cubiertas seminales o del fruto. Para producir germinación se requieren tratamientos como escarificación.
Combinada	El embrión posee una combinación de dormancia fisiológica más la impermeabilidad al agua. La germinación ocurre tratando ambas dormancias.

Existen antecedentes para otras especies de *Morella* que pueden orientar una investigación en fisiología de semillas de *M. pavonis*. Por ejemplo, semillas maduras de *M. rubra* (Asia) requieren 8 semanas de estratificación cálida (30/20 °C) más 12 semanas en estratificación fría (4°C) para obtener una germinación de aproximadamente 70%, a su vez la aplicación exógena de ácido giberélico (GA_3) determinan ser un tratamiento eficiente para romper dormancia, también se indica que la remoción del endocarpio duro junto con la aplicación de GA_3 incubadas a temperatura alternante (30/20 °C) durante 20 semanas promueven una germinación superior al 70% (Chen et al., 2008). Del mismo modo, semillas de *M. adenophora* (Asia) aumentaron su germinación alrededor de un 50%, además semillas de *M. rubra* requirieron estratificación a 21/15 °C durante 3 meses seguido de estratificación fría 5 °C, los resultados arrojan que la germinación aumentó al 68% (Chien et al.,

2000). Estas evidencias en las especies descritas señalan la presencia de dormancia fisiológica (PD) (Baskin & Baskin, 2014).

Por otra parte, un estudio desarrollado en la evaluación de los efectos de los tratamientos sobre la germinación en semillas de *M. nagi* en la región del Himalaya (Kumari et al., 2015), señala la presencia de dormancia física (Baskin & Baskin, 2014), debido a que la semilla posee un grado de impermeabilidad del endocarpio, la mayor germinación se obtuvo con la acción del ácido sulfúrico (H_2SO_4) durante 10 minutos, de la misma manera, Bhatt et al (2000) en su estudio con semillas de *M. esculenta* sugieren la presencia de dormancia física y definen que la principal causa de la baja tasa de germinación se debe a la cubierta impermeable que posee la semilla.

Además, las características morfoanatómicas del fruto y semilla no han sido reportadas en *Morella pavonis,* el estudio de estas contribuye información para esclarecer el tipo de dormancia presente e incluso la selección de un pretratamiento eficaz para la germinación. Investigaciones previas acerca de la anatomía de las semillas señalan la importancia de su estudio, de acuerdo a Parra Rivero et al. (2020) se determina que la principal causa de dormancia física en semillas de *Peltophorum pterocarpum* es la disposición y forma de los tejidos esclerenquimáticos que hacen parte de la cubierta seminal, ya que estos proporcionan a la semilla rigidez e impermeabilidad. El fruto de las Myricaceae posee una sola semilla en su interior que generalmente carece de endospermo y esta se encuentra protegida por un endocarpio pétreo (Lutzow-Felling and Gardner, 1995). En especies del género *Morella* se han reportado estudios referentes al fruto, principalmente referentes a la cubierta cerosa (Simpson & Ohlrogge, 2016), señalando que los frutos *M. pensylvanica* sintetizan una capa muy gruesa de cera superficial, su composición consiste en triacilglicerol, diacilglicerol y monoacilglicerol, la cera superficial resulta atractiva y digerible para algunas aves (Fordham, 1983), por esta razón puede ser útil como un mecanismo de dispersión de semillas (Place & Stiles, 1992). En la morfología del fruto de *M. rubra* (Nii et al., 2008) se muestra que existen más de 1200 columnas de jugo que surgen del exocarpio, estas contienen varias glándulas pequeñas con presencia de resina que pueden actuar como protección contra el daño de insectos.

Por otra parte, los hongos endófitos son microorganismos presentes en el tejido vegetal que permanecen en algún lapso del ciclo vital, estos pueden colonizar el interior de la planta y no causan enfermedad en el hospedero (Petrini, 1991).

La razón principal de su estudio radica en la importancia, debido a que estos se han venido utilizando en el control biológico de enfermedades y plagas en una variedad de plantas, estos inducen resistencia en la planta hospedera, promueven el desarrollo de las plantas, aumentan la tolerancia a sequía y el potencial uso para la producción de metabolitos secundarios (Strobel et al., 2001; Lin et al., 2007; Zhang et al., 2009; Cao et al., 2009).

Los hongos endófitos sistémicos se transmiten de forma vertical desde la planta huésped a sus semillas y estos son comúnmente mutualistas (Clay & Schardl, 2002). La presencia de hongos endófitos involucra el crecimiento de las plantas y la germinación de las semillas (Bao et al., 2019). Por ejemplo, se ha mostrado que semillas de *Achnatherum inebrins* inoculadas con un endófito son capaces de aumentar la tasa de germinación (Chen et al., 2021).

En el contexto de la germinación de las semillas de *Morella pavonis*, se exploran dos hipótesis clave. La primera sugiere la presencia de mecanismos de dormancia que restringen la germinación y podrían estar asociados a la morfología de la semilla. La segunda hipótesis postula la presencia de hongos endófitos en las semillas, cuya diversidad podría depender del origen geográfico y estar correlacionada con el grado de dormancia.

Existen 3 objetivos principales en este estudio: 1. Caracterizar la anatomía y morfología de los frutos; 2. Establecer un protocolo para un eficiente acondicionamiento y germinación de semillas; 3. Determinar la micobiota endófita presente en semillas de *Morella pavonis* (C.DC.) Parra-Os.

Materiales y métodos

Material Vegetal

Se usaron semillas de *Morella pavonis* almacenadas en el Banco Base de Semillas de INIA- Vicuña. Se proporcionaron semillas de 4 lotes provenientes de dos provincias (**Figura 1**), cada uno con distintos lugares de origen y fechas de recolección (**Cuadro 2**).

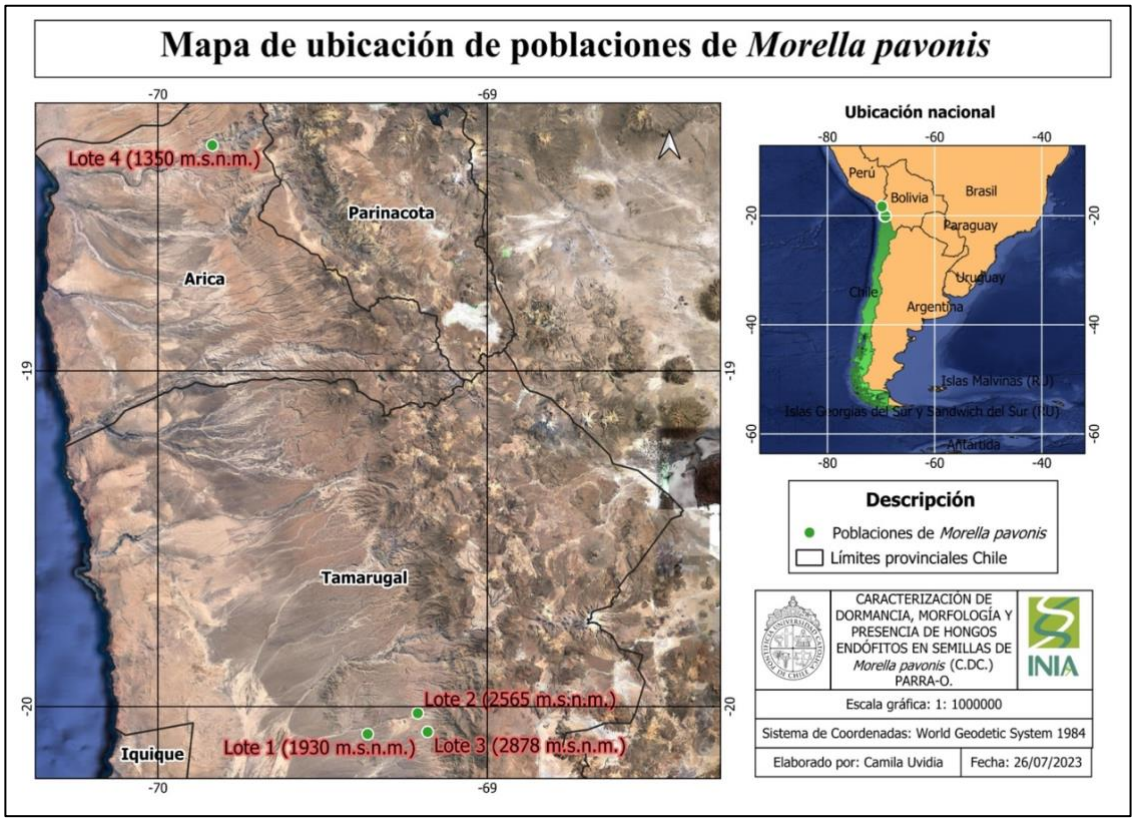


Figura 1. Georreferenciación de las poblaciones de *Morella pavonis* usadas en el estudio.

Cuadro 2. Información sobre las poblaciones de *Morella pavonis* usadas en el estudio.

Lote	Localidad	Fecha de colecta	Altura (msnm)	LATDEG	LONGDEG
Lote 1	Cuesta de Dupligsa Palca	15-11-2022	1930	-20,08185	-69,36346
Lote 2	Iquiuca	15-11-2022	2565	-20,01981	-69,21154
Lote 3	Imagua	15-11-2022	2878	-20,07553	-69,1814
Lote 4	Chironta, Km 20 del Lluta.	11-01-2023	1350	-18,32805	-69,83511

Caracterización morfológica de los frutos

Se registró el tamaño, color y la apariencia externa de los endocarpios de 10 frutos y semillas de *Morella pavonis,* mediante el uso de una lupa estereoscópica (NIKON-SMZ-10) y una regla milimétrica.

Análisis histológico

Para el estudio histológico se emplearon las técnicas anatómicas descritas por Albornoz (2010). Se seleccionaron 20 frutos completos y se fijaron en alcohol formol acético (FAA), estos fueron deshidratados mediante una batería de alcoholes crecientes, para ello las semillas fueron sumergidas en distintas disoluciones alcohólicas que oscilaron entre 50 y 100% y una sumersión final en alcohol butílico terciario puro. Posteriormente fueron conservadas en parafina con el objetivo de seccionar las semillas. Se realizaron cortes histológicos transversales y longitudinales utilizando un micrótomo (JUNG AG HEIDELBERG) y tinción con safranina y verde rápido. Las secciones se observaron y analizaron mediante microscopía óptica y finalmente fueron fotografiadas.

Caracterización de la imbibición de las semillas

Para evaluar si el agua fue capaz de ingresar al embrión penetrando el endocarpio, 30 semillas correspondientes al Lote 2 se embebieron en una solución de azul de metileno (1g/100mL). Posteriormente fueron retiradas de manera periódica de la solución, iniciando en 3 horas y finalizando a los 12 días. Fueron lavadas con agua destilada, secadas con papel absorbente y expuestas a temperatura ambiente por 20 minutos para completar el secado de la superficie exterior de las semillas. Finalmente, las semillas se seccionaron con bisturí con un corte longitudinal y con ayuda de una lupa estereoscópica se observó si el embrión logró ser teñido.

Ensayo de viabilidad

Para evaluar viabilidad, 100 semillas enteras de cada lote fueron embebidas durante 12 días en la solución al 1% de tetrazolio. Transcurrido el tiempo las semillas fueron lavadas con agua destilada y fueron seccionadas con bisturí mediante un corte longitudinal con el objetivo de visualizar bajo lupa estereoscópica si estas lograron ser teñidas.

Evaluación de respuesta al secado

Contenido de humedad en semillas de *M. pavonis*

Se determinó el contenido de humedad de las semillas frescas de acuerdo con el protocolo de International Rules for Seed Testing (ISTA, 2020) mediante el método directo de secado en horno. Se pesaron dos muestras con 1,5 g de semillas cada una, estas fueron puestas en horno a 103 ± 1 °C durante 18 horas. Posteriormente las semillas se trasladaron a un desecador por 45 minutos para ser enfriadas y finalmente pesadas. Los datos obtenidos se usaron en la ecuación 1:

$$\%H_{bh} = \frac{m_h - m_s}{mh} x100 \qquad \text{(Eq.1)}$$

Donde: m_h corresponde al peso de la muestra húmeda y m_s al peso de la muestra seca.

Efecto de la desecación en la viabilidad de la semilla

Ciento veinte semillas frescas con un contenido de humedad inicial del 21%, de los Lotes 1, 3 y 4, fueron puestas en un desecador con sílica, con el objetivo de evaluar la tolerancia a la desecación y el efecto en la viabilidad. Se estimo la pérdida de humedad mediante registro periódico del peso de la semilla, y hasta que estas alcanzaron un contenido de humedad del 7%.

Evaluación de la capacidad germinativa

Se consideró el diseño de varios experimentos con el objetivo de evaluar diferentes factores involucrados en la germinación de *M. pavonis,* y así determinar la presencia de dormancia y su posible clasificación.

Una vez completado cada tratamiento, las semillas fueron sembradas en placas Petri (90 mm de diámetro) con dos láminas de papel filtro saturadas en agua destilada y luego fueron incubadas a una temperatura de 20°C. La germinación fue evaluada periódicamente hasta 60 días después de la siembra; se consideró como semilla germinada cuando la radícula había emergido al menos 2 mm sobre la superficie externa del endocarpio.

Efecto de la estratificación

Se usaron semillas provenientes de los Lotes 1 y 2 para evaluar la influencia de la temperatura, el experimento incluyó diferentes temperaturas de estratificación. En el (**Cuadro 3**) se detallan los tratamientos. Una vez completado cada tratamiento las semillas fueron sembradas a 20 °C.

La estratificación es un tratamiento empleado para romper la dormancia fisiológica. En la estratificación fría, las semillas se conservan a temperaturas bajas (0 a 10 ºC) para replicar condiciones invernales, en contraste con la estratificación cálida, en donde las semillas requieren ser expuestas a temperaturas elevadas (22 a 30 °C) para la germinación (Patiño et al., 1983; Hartmann & Kester, 1977; Hartmann & Kester, 1988, Donoso, 1993; Castillo et al., 2013).

El tratamiento de estratificación cálida seca (30/20 °C, 60 días) se planteó con el objetivo de determinar *after- ripening*, que es la disminución gradual de la dormancia en semillas maduras y recién cosechadas como resultado de un almacenamiento en ambientes secos (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006).

Cuadro 3. Tratamientos de estratificación realizados para evaluar el efecto de la temperatura en la germinación de semillas de *Morella pavonis*.

Tratamiento	Fecha de siembra
Control	20-12-2022
Estratificación cálida húmeda (30/20 °C, 60 días)	20-12-2022
Estratificación cálida seca (30/20 °C, 60 días)	07-03-2023
Estratificación cálida seca (30/20 °C, 60 días) + Estratificación fría (4°C, 90 días)	23-05-2023
Estratificación fría (4°C, 90 días)	23-03-2023

Uso de ácido giberélico

Se evaluó la acción del ácido giberélico (GA_3; GIBERPLUS® 2,0%), embebiendo semillas de los Lotes 3 y 4 durante 48 horas en una solución a una concentración de 500 ppm, una vez transcurrido el tiempo estas fueron sembradas a una temperatura de 20°C y se evaluó su germinación.

Efecto de la escarificación

Este estudio fue llevado a cabo con el propósito de investigar el posible papel del endocarpio leñoso en el proceso de germinación de las semillas, se instaló un experimento que consistió en sumergir semillas del Lote 3 en ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 96%, después fueron lavadas con abundante agua corriente. Se analizaron distintos tiempos de imbibición en el ácido: a) 5 min, b) 10 min, c) 15 min, d) 20 min. Finalmente, las semillas fueron sembradas a una temperatura de 20 °C y se evaluó su germinación.

Efecto de tratamientos combinados

Se usaron semillas del Lote 4, con el propósito de evaluar el efecto de tratamientos combinados en la capacidad germinativa para ello se instalaron diversos experimentos (**Cuadro 4**). Posteriormente las semillas fueron sembradas en placas Petri a una temperatura de 20 °C.

Cuadro 4. Experimentos para evaluar el efecto de tratamientos combinados en la germinación de *Morella pavonis.*

Tratamiento	Fecha de siembra
Control	11-05-2023
GA_3 (500 ppm)	11-05-2023
Estratificación fría 4°C (30 días)	11-06-2023
H_2SO_4 (10 min)	15-05-2023
H_2SO_4 (10 min) + GA_3 (500 ppm)	17-05-2023
H_2SO_4 (10 min) + Estratificación fría 4°C (30 días)	15-06-2023

Tratamientos para evaluar temperaturas alternantes

Se evaluaron dos temperaturas alternantes: 20/10 y 30/20 °C, en semillas del Lote 4 para determinar su efecto en la germinación, para ello se instaló un control y un tratamiento en donde las semillas fueron embebidas en GA_3 a una concentración de 500 ppm.

Diseño experimental

Se aplicó un diseño completamente al azar (DCA). Para evaluar los tratamientos de: desecación en sílica, la estratificación, escarificación, uso de GA_3 500 ppm, se usaron 3 repeticiones de 40 semillas cada una.

En lo que respecta a tratamientos combinados y efecto de las temperaturas alternantes se usaron 3 repeticiones de 30 semillas provenientes del Lote 4.

Análisis estadístico de la germinación

Para cumplir con la distribución normal, los porcentajes de germinación final fueron transformados mediante el arcoseno de la raíz cuadrada (Sokal & Rohlf, 1995), después fueron analizados estadísticamente usando el procedimiento del modelo lineal general del programa R (V.4.3.1) a través de Rstudio. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar la existencia de diferencias significativas entre tratamientos y comparación de medias por prueba de Tukey $p<0,05$.

Aislamiento de hongos endófitos en semillas de *M. pavonis*

Semillas provenientes del Lote 3 y 4 fueron sometidas a desinfestación superficial, siguiendo el protocolo modificado descrito por Ernst et al (2003): etanol al 70% durante 1 minuto, hipoclorito de sodio al 5% durante 2 minutos, 3 enjuagues finales con agua destilada estéril de 2 minutos cada uno.

Para conocer la efectividad de la desinfestación, una alícuota de 100 µL de agua usada en el último enjuague fue sembrada en el medio de cultivo de APD (Agar Papa Dextrosa).

En condiciones asépticas y bajo campana de flujo laminar (LABCONCO PURIFIER CLASS II BIOSAFETY CABINET), se sembraron de manera equidistante 10 semillas de *M. pavonis* en una placa Petri de 90 mm de diámetro, sobre medio de cultivo APD suplementado con cloranfenicol (100 µg. mL- 1) para inhibir el crecimiento bacteriano. Se realizaron 3 repeticiones para cada Lote, cada repetición consistió en una placa Petri. Las placas fueron incubadas a 20 °C y se revisó el crecimiento fúngico hasta los 21 días. Los endófitos fúngicos emergentes fueron posteriormente llevados a cultivo puro en placas Petri con APD.

Caracterización cultural y morfológica de hongos endófitos

Las características macroscópicas y microscópicas de los morfotipos emergentes de endófitos fueron descritas de acuerdo a lo detallado en el Manual de Micología por Shtayeh et al (1998: p.11), para la evaluación de características macroscópicas se

analizaron distintos parámetros de cada colonia como: color, forma, apariencia, consistencia, presencia de exudación, etc. En lo que respecta a la caracterización microscópica, en un portaobjetos se depositó una porción de micelio para analizar las distintas estructuras fúngicas, tanto somáticas como reproductivas bajo un microscopio óptico (ZEISS/Primostar 3). De acuerdo a las características estudiadas, los aislamientos fueron agrupados en morfotipos (Magalhães et al., 2008).

El término “morfotipo” se usa para referirse a una categoría de hongo que se fundamenta en las características morfológicas y que agrupa hongos que tienen características visuales similares.

Análisis estadístico- hongos endófitos

Para el cálculo de la abundancia relativa (AR%) los datos fueron reemplazados en la ecuación 2 (Petrini et al., 1992):

$$AR\% = \frac{\text{número de individuos de un morfotipo}}{\text{número total de individuos}} x\ 100 \qquad \text{(Eq.2)}$$

Para la representación de la diversidad alfa, se calcularon aquellos que combinan componentes de equidad y riqueza:

Índice de Simpson, que muestra la dominancia, por ende, cuanto mayor es el valor mayor es la dominancia de una o más especies. Simpson asocia a las especies comunes y calcula la probabilidad de que dos individuos suprimidos al azar de una comunidad pertenezcan al mismo morfotipo, ya que eleva al cuadrado pequeñas proporciones, de esta manera se obtienen valores pequeños (Coelho, 2017).

Todos los datos se analizaron y representaron gráficamente utilizando el paquete vegan del programa R (V.4.3.1) a través de Rstudio.

Resultados

Morfología del fruto de *Morella pavonis*

El fruto de *Morella pavonis* corresponde a una drupa esférica cuyo tamaño osciló entre 3,0 y 3,5 mm de diámetro; cubierta por papilas cerosas de coloración blanquecina grisácea que corresponden a prolongaciones multicelulares del exocarpio (**Figura 2A**), la parte interna del fruto está constituida por un endocarpio leñoso con coloración pardo-grisácea (**Figura 2B**), una semilla pequeña y solitaria, con un embrión de 2 mm de largo (**Figura 2C**).

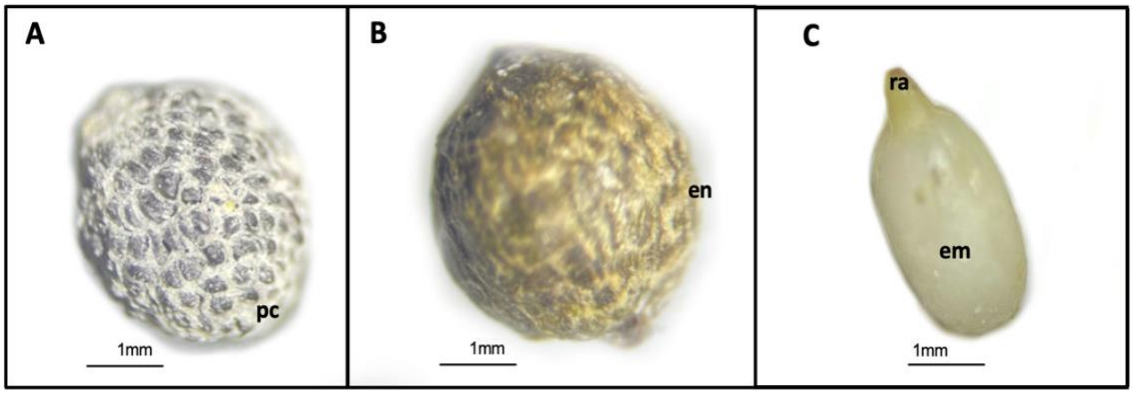


Figura 2. Morfología de frutos de *Morella pavonis*. **A)** Fruto completo. **B)** Endocarpio. **C)** Embrión. Abreviaturas: en=endocarpio, pc=papilas cerosas, em=embrión.

Análisis histológico

La semilla de *Morella pavonis* proviene de un primordio seminal ortótropo (**Figura 3A**) corresponde al grupo de las exalbuminadas. Tiene un embrión recto, completamente desarrollado con dos cotiledones plano-convexos que poseen células con un alto contenido de sustancias tánicas evidenciadas por la coloración roja en las vacuolas, ambos recorridos longitudinalmente por un cordón central de procambium. El desarrollo temprano del hipocótilo revela el proceso de germinación fanerocotilar, mientras que el meristema apical caulinar tarda más en comenzar su desarrollo (**Figura 3B**). Se evidenció que el embrión está rodeado por una epidermis cuya coloración puede revelar la presencia de pigmentos flavonoides. La semilla presenta una testa monoestratificada compuesta por células rectangulares con paredes anticlinales de mayor longitud. No se evidencia presencia de pigmentos en sus vacuolas. (**Figura 3C**).

El estudio histológico del endocarpio mostró la presencia de esclereidas agrupadas densamente, lo que le otorga la dureza característica (**Figura 4B**), sin embargo, este tejido posee una fisura que lo recorre longitudinalmente, permitiendo la apertura del

endocarpio en dos mitades semejantes, al momento de la germinación, ayudando a la expansión embrionaria y facilitando la germinación. (**Figura 3A**).

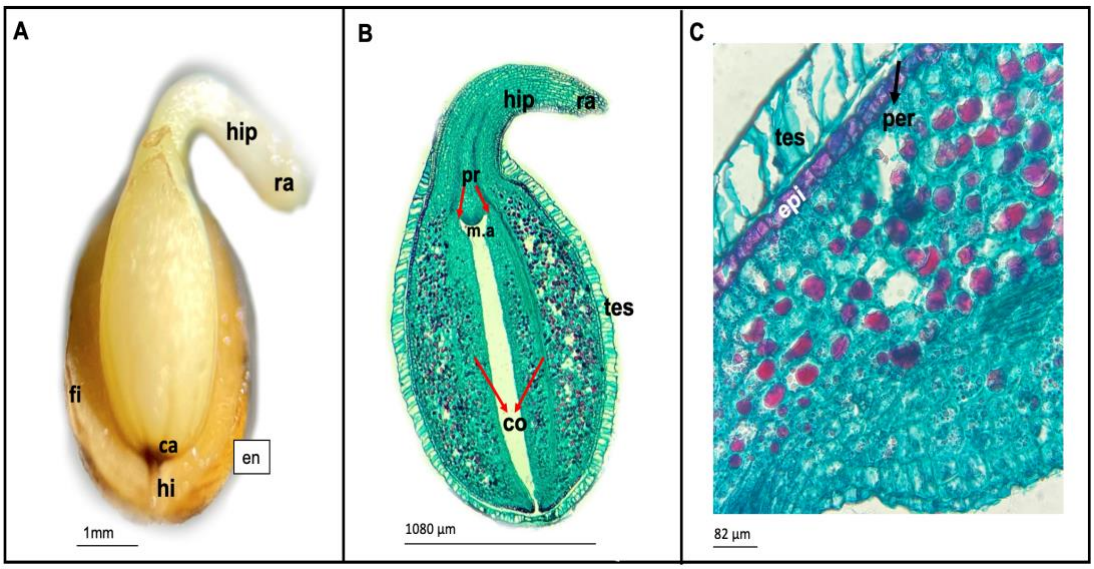


Figura 3. Anatomía e histología del embrión de *Morella pavonis*. A) Embrión germinado. B) Corte histológico del embrión (4x). C) Capas embrionarias (40x). Abreviaturas: ca=extremo calaza., hi=hilio, ra=radícula, hip=hipocótilo, pr=procambium, m.a=meristema apical, co=cotiledones, tes=testa, epi=epidemis, fi= fisura, per= perispermo, en=endocarpio

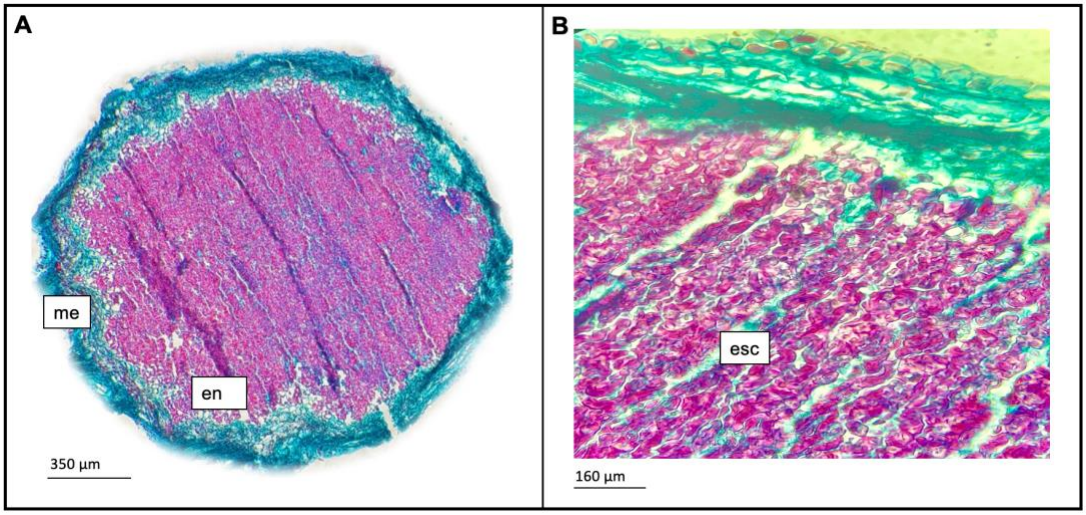


Figura 4. Endocarpio de *Morella pavonis.* **A)** Corte histológico transversal del endocarpio (10x). **B)** esclereidas (40x). Abreviaturas: me=mesocarpio, en=endocarpio, esc=esclereidas.

Caracterización de la Imbibición

Al sumergir los frutos en la solución de azul de metileno se observó la entrada paulatina del colorante, en las primeras horas se tiñeron las papilas cerosas, luego se tiñó el endocarpio pintando ligeramente la superficie para después atravesarlo por completo en un largo periodo de 10 días (**Figura 5A-E**), Finalmente, en los dos días siguientes, el embrión fue completamente impregnado por el colorante (**Figura 5F**).

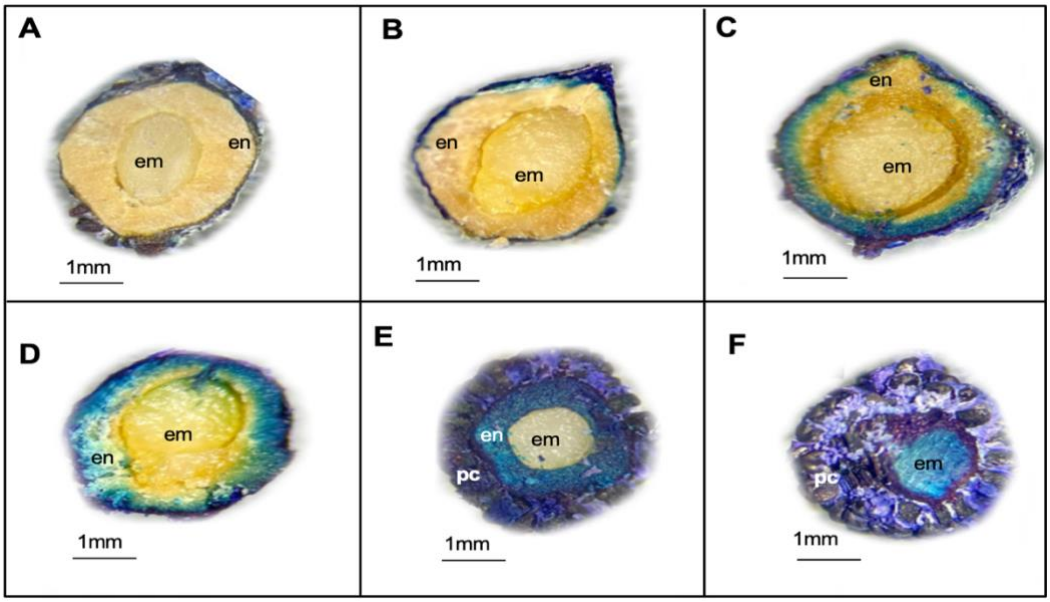


Figura 5. Secciones longitudinales de frutos y semilla de *Morella pavonis* después de distintos tiempos de imbibición en una solución de azul de metileno (1g/100 mL). **A)** 3 horas. **B)**1 día. **C)** 2 días. **D)** 8 días. **E)** 10 días y **F)** 12 días, después de inicio de la imbibición. Abreviaturas: en= endocarpio, em=embrión, pc=papilas cerosas.

Ensayo de viabilidad

Un embrión con más del 50% de su superficie teñida de rojo por efecto de la solución de tetrazolio fue considerado viable (**Figura 6AB**), mientras que aquellos teñidos en un menor porcentaje o no teñidos, se clasificaron como no viables (**Figura 6CD**). El promedio del porcentaje se calculó sobre la base de 100 semillas usadas por cada lote (**Cuadro 5**).

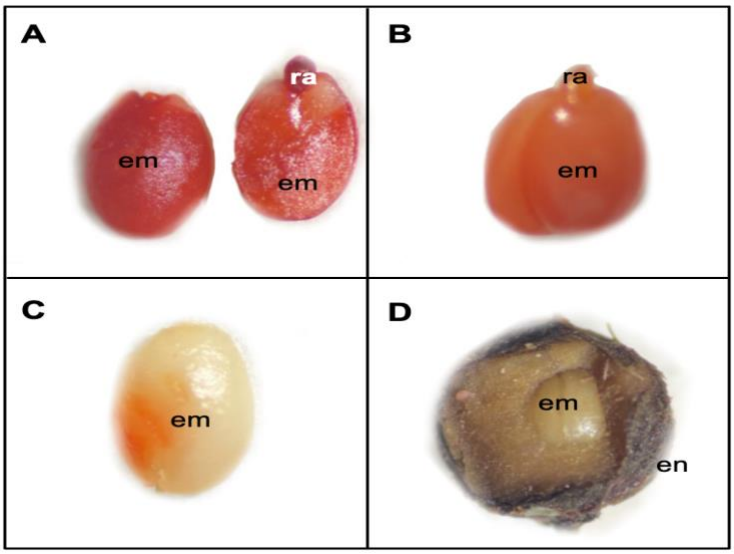


Figura 6. Evaluación de viabilidad de semillas de *Morella pavonis* usando el test de tetrazolio. **A, B)** semillas viables. **C, D)** semillas no viables. Abreviaturas: em= embrión, ra= radícula, en=endocarpio.

Cuadro 5. Resultado de la viabilidad de semillas de *Morella pavonis* de los lotes en estudio.

Lote	Embriones teñidos 100%	Embriones teñidos < del 50% de la superficie	Embriones no teñidos	Viabilidad (%)
1	79	3	18	79
2	75	5	20	75
3	81	8	11	81
4	88	10	2	88

Evaluación de respuesta al secado

Contenido de humedad en semillas de *Morella pavonis* y efecto de la desecación en la viabilidad de la semilla

El cálculo del contenido de humedad inicial en base húmeda dio como resultado el 21,5% para semillas maduras de *M. pavonis*.

Al cabo de 31 días de que las semillas de los distintos lotes fueron expuestas a sílica, el contenido de humedad disminuyó hasta alcanzar 7% (**Figura 7**).

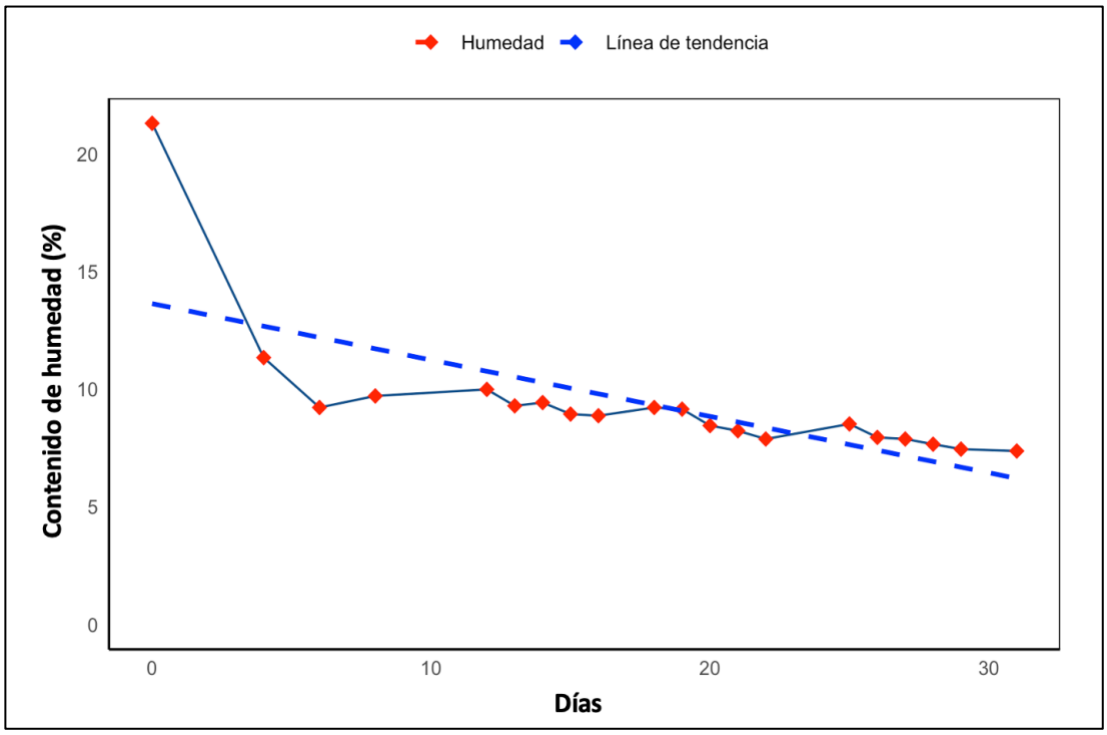


Figura 7. Cambios en el contenido de humedad en semillas de *Morella pavonis* expuesta a desecación en sílica.

La desecación en sílica mostró efectos positivos en la germinación. En el Lote 1 el efecto mostró un comportamiento elevado (48,6%) en comparación con el control (semillas sin secar) que presentó una germinación del 15, 4%, el test ANOVA resultó significativo (p=0,005). En el Lote 3, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p=0,09),

Sin embargo, la germinación control mostró el 1,6 %, mientras que las semillas desecadas en sílica aumentaron la germinación al 9%. Por otra parte, en el Lote 4 las semillas expuestas a sílica mostraron el mayor valor de germinación (87%) registrado en este estudio, mientras que la germinación control dio como resultado el 43,33%, la prueba estadística indicó que existen diferencias significativas entre tratamientos (p=0,008) (**Figura 8**).

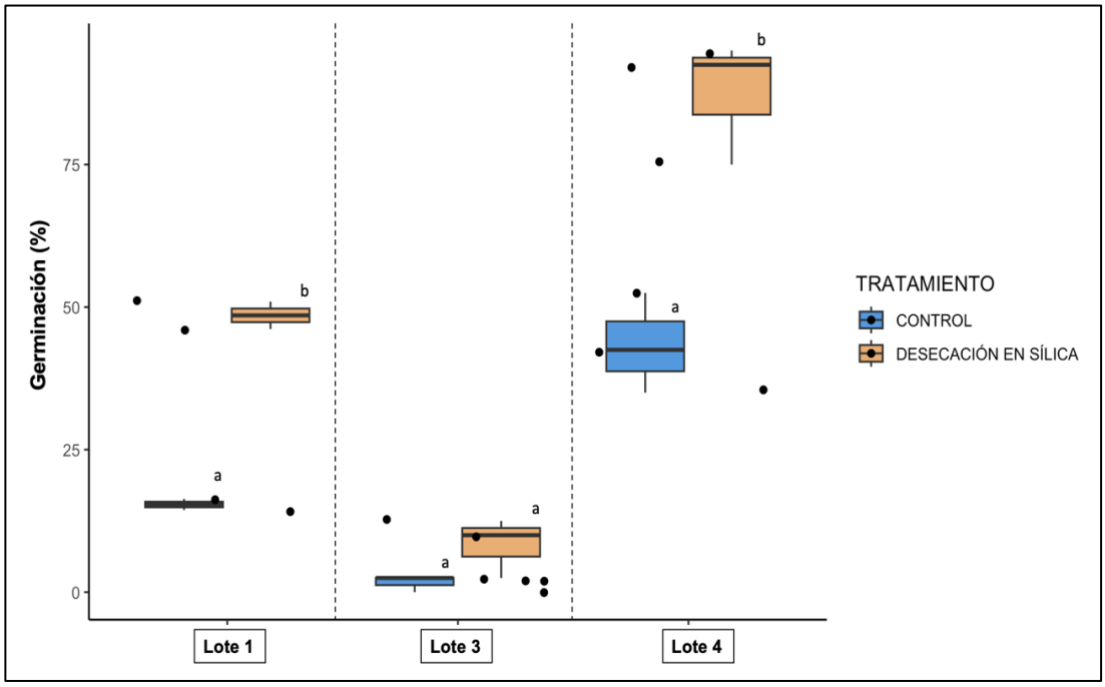


Figura 8. Germinación de semillas de *Morella pavonis* tras disminución del contenido de humedad derivadas del ensayo de desecación en sílica en distintos lotes**.** Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

Evaluación de la capacidad germinativa

Efecto de la estratificación

Las semillas sin tratamiento exhibieron tasas de germinación del 18,3 y 4,1% para los Lotes 1 y 2, respectivamente. En ambos lotes las distintas estratificaciones mostraron comportamientos similares en la germinación, en el Lote 1 el periodo de estratificación en frío a 4 °C durante 90 días resultó algo eficaz, ya las semillas tratadas alcanzaron solo 28,3% de germinación. Del mismo modo, en el Lote 2 la influencia de la estratificación fría incremento la germinación a un 33%.

Además, en ambos lotes, la aplicación del tratamiento de estratificación húmeda a una temperatura de 30/20 °C durante un periodo de 60 días resultó en un aumento en la germinación a un 24% y 10% en el Lote 1 y 2, respectivamente.

La estratificación seca a 30/20 °C por un periodo de 60 días y la misma estratificación, pero tratada además con un periodo de estratificación fría a 4 °C por 90 días, no mostraron ser eficientes en el Lote 1 y 2, debido a que su germinación fue bajo, de un 11,6% y al 1,6%, respectivamente (**Figura 9**). En el Lote 1, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (p=0,07),

contrariamente, en el Lote 2 la estratificación en frío mostró un incremento estadísticamente significativo (p=0,001) en la germinación.

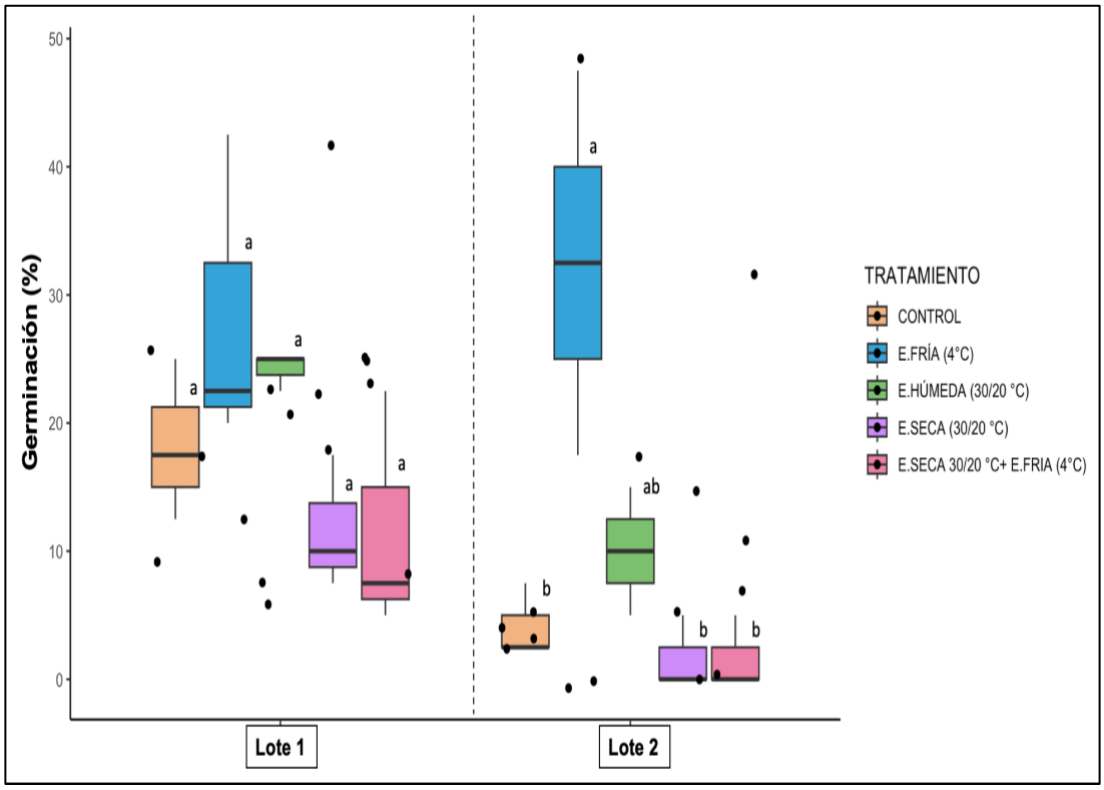


Figura 9. Germinación fisiológica de semillas de *Morella pavonis* tras distintos pretratamientos de estratificación, para los lotes 1 y 2. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

Uso de GA_3

La germinación aumentó después de que las semillas fueron embebidas con GA_3 500 ppm por un lapso de 48 horas, en los Lotes 3 y 4 se mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$). Se mostró que el uso del GA_3 es altamente efectivo sobre todo en el Lote 3 cuya germinación control mostró un 2%, mientras que al ser embebidas en GA_3 la germinación aumentó al 78%. Del mismo modo en el Lote 4, el uso del GA_3 aumentó la germinación a 73%); sin embargo, este lote se mostró como el menos dormante en este estudio ya que el valor de la germinación control alcanzó el 43% (**Figura 10**).

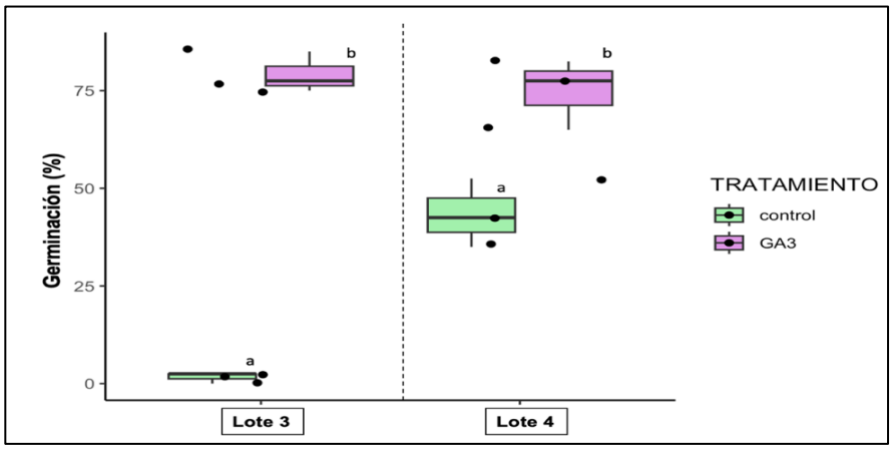


Figura 10. Germinación de semillas de *Morella pavonis* posterior a la imbibición en GA_3 500ppm durante 48 horas analizada en dos lotes. Medias con las mismas letras son estadísticamente iguales.

Efecto de la escarificación

En el Lote 3, el mayor porcentaje de germinación se obtuvo con aquellas semillas que fueron tratadas con Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) durante 10 minutos (25%). Al reducir el tiempo de escarificación a 5 minutos también se redujo también la germinación (12,5%). Además, incrementando el tiempo en el que las semillas permanecieron en H_2SO_4 por 15 y 20 minutos, la germinación disminuyó a 10% y 5%, respectivamente. Aquellas semillas que no fueron tratadas tuvieron una germinación del 9,2% (**Figura 11**). El análisis de datos mostró diferencias significativas en la germinación en aquellas semillas en donde se aplicó escarificación durante 10 minutos ($p<0,05$) en comparación con la germinación de las semillas escarificadas durante 15 y 20 minutos.

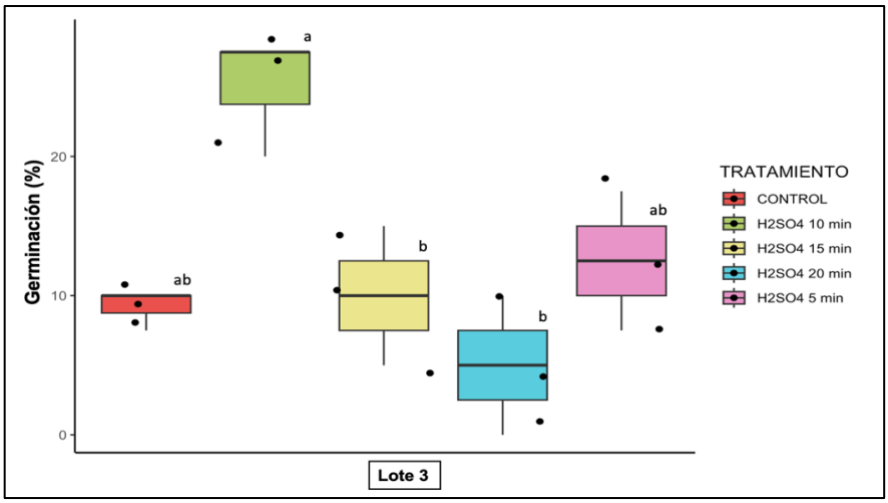


Figura 11. Germinación de semillas de *Morella pavonis* escarificadas con H_2SO_4 provenientes del lote 3. Medias con las mismas letras son estadísticamente iguales.

Efectos de tratamientos combinados

Se implementaron diversos tratamientos en el Lote 4 con el fin de validar los efectos observados previamente en el Lote 3. Además, se exploró la combinación de tratamientos con el objetivo de mejorar el porcentaje de germinación. El tratamiento que mostró mayor eficacia fue la estratificación fría a 4 °C durante 30 días, alcanzando una germinación del 84,4%. En comparación, el grupo de control exhibió una germinación del 71,1%, mientras que el uso de GA3 a 500 ppm y la escarificación con H_2SO_4 durante 10 minutos mostraron tasas de germinación del 76,6% y 63,3%, respectivamente (**Figura 12**).

La evaluación de la combinación de tratamientos con el control reveló una disminución significativa en la germinación al 54,4% al combinar H_2SO_4 por 10 minutos con el uso de GA_3 500 ppm. Asimismo, al analizar el tratamiento de H_2SO_4 por 10 minutos seguido de una estratificación fría a 4 °C durante 30 días, se observaron diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control, registrando una germinación del 28,8% (**Figura 12**). Aunque es cierto que la mayoría de los valores no resultaron estadísticamente significativos durante el análisis, algunos tratamientos mostraron una eficacia relativa superior a otros.

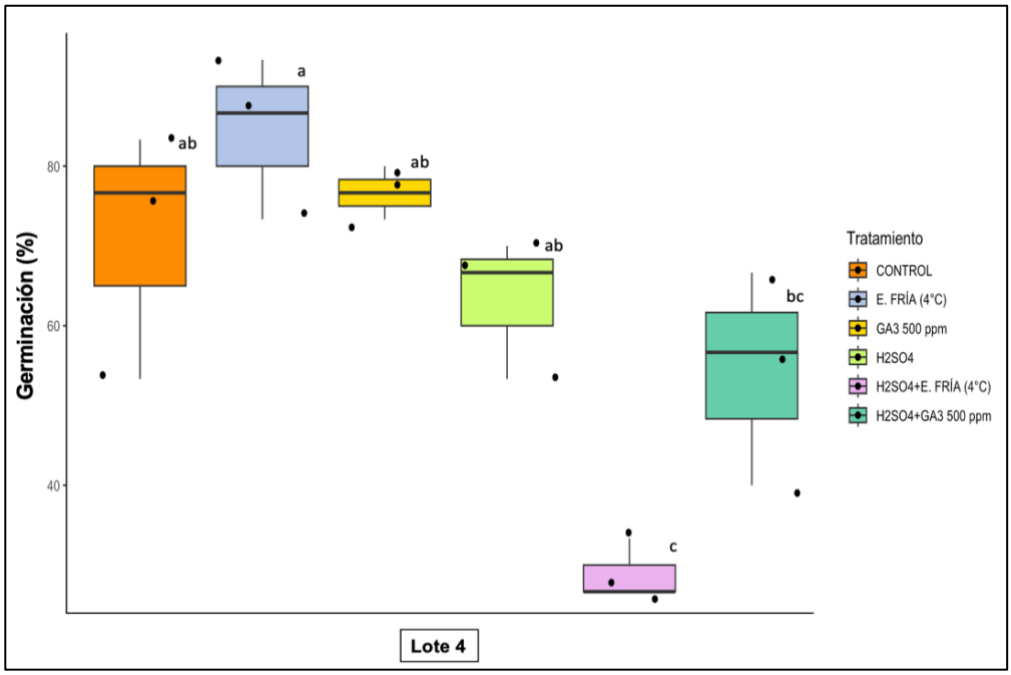


Figura 12. Germinación de semillas de *Morella pavonis* con aplicación de tratamientos combinados provenientes del lote 4. Medias con las mismas letras son estadísticamente iguales.

Efecto de las temperaturas alternantes

El análisis de datos por el test ANOVA no resultó ser significativo (p>0,05) en el uso de ambas temperaturas alternas, se observó que la germinación en 20/10 °C en el control y en el tratamiento con GA_3 500 ppm alcanzó el 60% y 62,2%, respectivamente, además, esta incrementó en un 20% en ambos casos cuando la temperatura alterna fue de 30/20 °C (**Figura 13**).

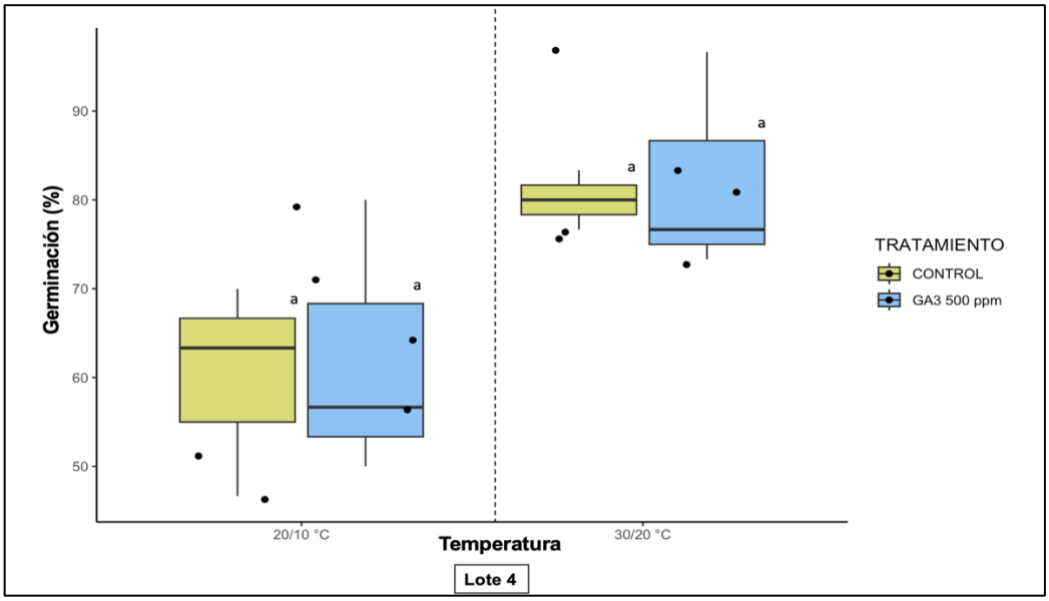


Figura 13. Germinación de semillas de *Morella pavonis* en distintas temperaturas alternas. Medias con las mismas letras son estadísticamente iguales.

Aislamiento de hongos endófitos en semillas de *Morella pavonis*

Abundancia relativa de morfotipos

La evaluación de las características macro y microscópicas de los hongos endófitos sirvieron para agrupar los distintos morfotipos encontrados en este ensayo, dando un total de 9 aislamientos. Los morfotipos presentes en el Lote 3 son completamente diferentes a los observados en el Lote 4. En el Lote 3 se observó la presencia del morfotipo 1 y 2 con una abundancia del 75% y 25%, respectivamente. En el caso del Lote 4 se encontraron 7 morfotipos con porcentajes de abundancia relativa que oscilan entre 7% y 36% (**Figura 14**).

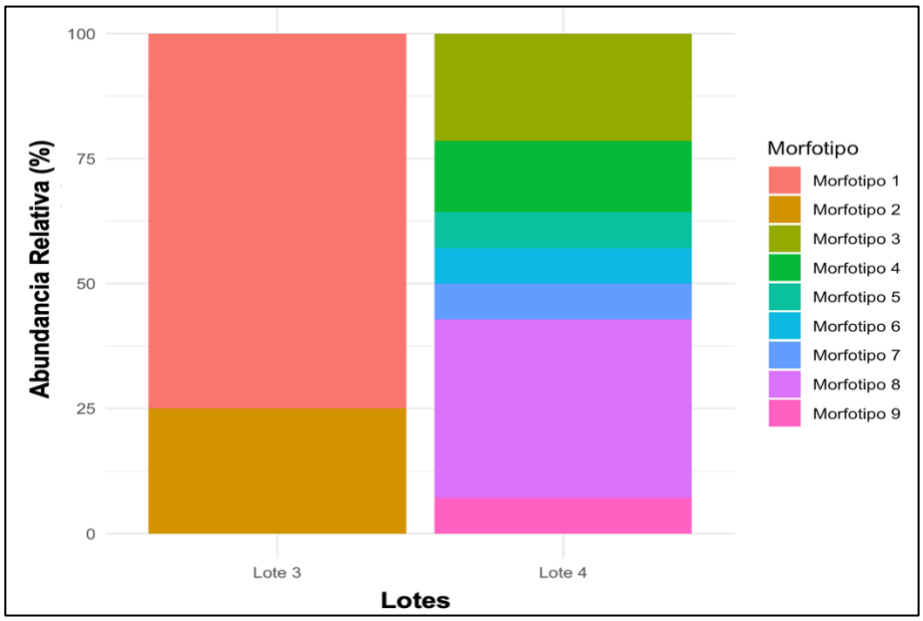


Figura 14. Abundancia relativa de morfotipos fúngicos endófitos provenientes de semillas de *Morella pavonis*.

Análisis de la diversidad alfa de morfotipos

El Lote 4 exhibió valores superiores en ambos índices, indicando una diversidad más elevada y una equidad en la distribución de especies en comparación con el Lote 3 (**Cuadro 6**).

Cuadro 6. Índices de diversidad alfa (Shannon y Simpson) calculados para los morfotipos endófitos fúngicos aislados de semillas de *Morella pavonis* del Lote 3 y 4.

Lotes	Índice de Shannon	Índice de Simpson
Lote 3	0,56	0,38
Lote 4	1,73	0,78

Características macroscópicas y microscópicas de hongos endófitos

a) Hongos endófitos presentes en el Lote 3

Morfotipo 1

Colonia de forma circular, posee un borde entero, el micelio es aterciopelado y elevado, con coloración gris clara a los 7 días de evaluación, tras el paso del tiempo esta cambia a grisácea oscura (**Figura 15A**). La (**Figura 15B**) mostró diferentes características microscópicas como hifas hialinas y septadas, además, se observó la

presencia de conidióforos, fialides y conidias globosas con una disposición dispersa y/o en pequeñas agrupaciones.

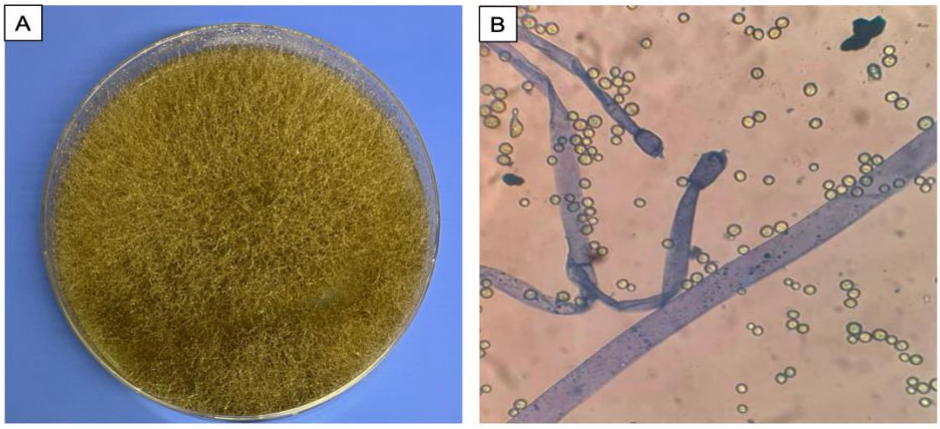


Figura 15. Morfología del Morfotipo 1: A) crecimiento micelial en medio de cultivo APD. B) estructuras somáticas visualizadas al microscopio con objetivo 40X.

Morfotipo 2

Colonia de coloración blanquecina, tras el paso del tiempo esta adquirió una coloración color beige, posee forma circular y un borde entero, chata, sin presencia de elevación, pero uniforme (**Figura 16A**), en lo que respecta a las características microscópicas, se observó la presencia de hifas hialinas y septadas, con presencia de conidias de forma elipsoidal con disposición en conjunto (**Figura 16B**).

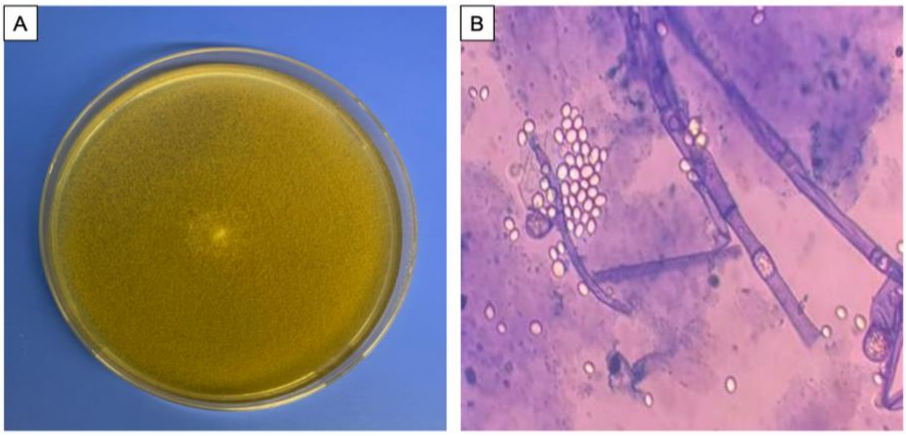


Figura 16. Morfología del Morfotipo 2: A) crecimiento micelial en medio de cultivo APD. B) estructuras somáticas visualizadas al microscopio con objetivo 40X.

b) Hongos endófitos presentes en el Lote 4

Morfotipo 3

Colonia de lento crecimiento, de borde circular y entero, micelio algodonoso de color beige, el borde presentó coloración blanquecina bien definida con aspecto flocoso

(**Figura 17A**). En las características microscópicas se visualizó la presencia de apresorios hialinos (**Figura 17B**) y la presencia de conidias amigdaliformes con disposición en pares a veces solitarias (**Figura 17C**).

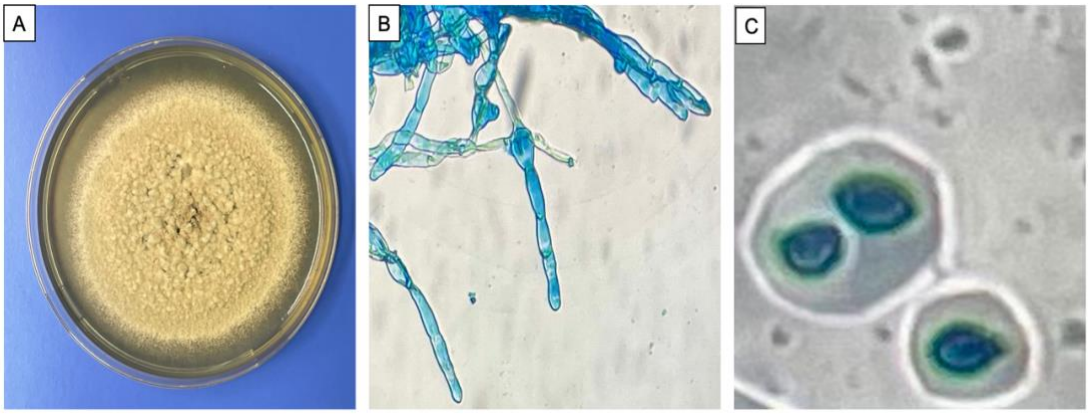


Figura 17. Morfología del Morfotipo 3: A) crecimiento micelial en medio de cultivo APD. B, C) estructuras somáticas visualizadas al microscopio con objetivo 40X y 100X, respectivamente.

Morfotipo 4

El crecimiento de la colonia fue rápido de borde entero y circular, micelio de coloración irregular, grisácea oscura en el interior, un borde y un sector de la colonia color grisáceo claro, de tipo algodonoso (**Figura 18A**). La observación de estructuras microscópicas mostró hifas hialinas cenocíticas (**Figura 18B**) y existencia de conidias de tipo fusiforme dispuestas en agrupaciones (**Figura 18C**).

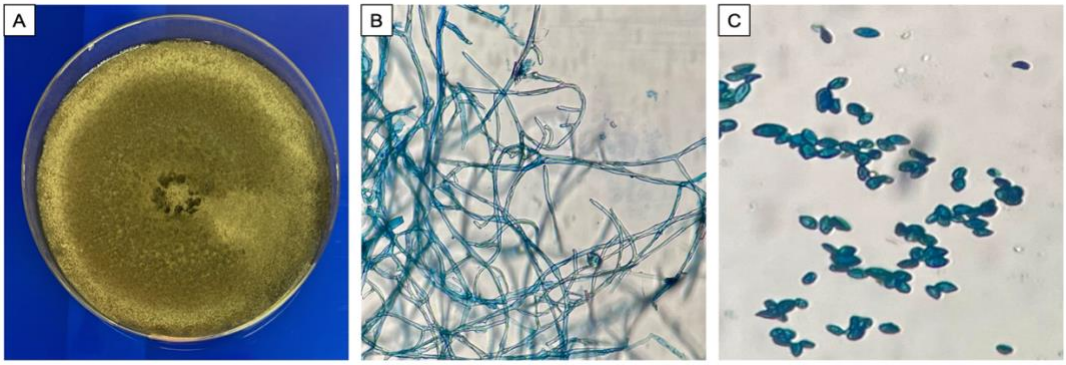


Figura 18. Morfología del Morfotipo 4: A) crecimiento micelial en medio de cultivo APD. B, C) estructuras somáticas visualizadas al microscopio con objetivo 40X.

Morfotipo 5

Colonia de crecimiento rápido, circular y de borde entero, el micelio se mostró algodonoso y distribuido en anillos alternos de coloración grisácea clara y oscura,

que además tiñeron el medio de cultivo APD (**Figura 19A**). En las estructuras microscópicas se evidenció la presencia de esferocistos (**Figura 19B**) y conidias de tipo ovadas (**Figura 19C**).

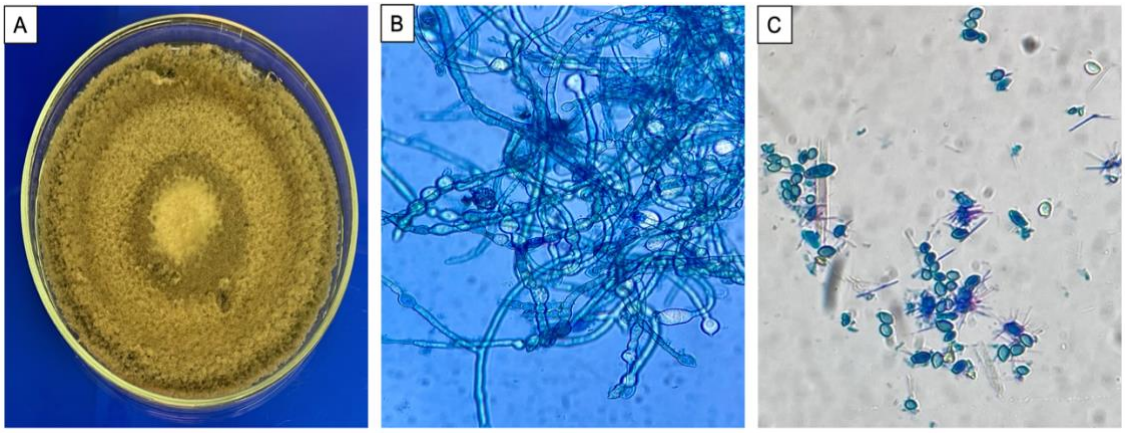


Figura 19. Morfología del Morfotipo 5: A) crecimiento micelial en medio de cultivo APD. B, C) estructuras somáticas visualizadas al microscopio con objetivo 40X.

Morfotipo 6

Colonia de crecimiento lento, de textura plana, borde entero y circular, micelio muy compacto con coloración grisácea clara en su interior y un borde de color gris oliva (**Figura 20A**). En lo que respecta a las estructuras microscópicas, se observó la presencia de hifas hialinas y septadas y conidias elipsoidales (**Figura 20B**).

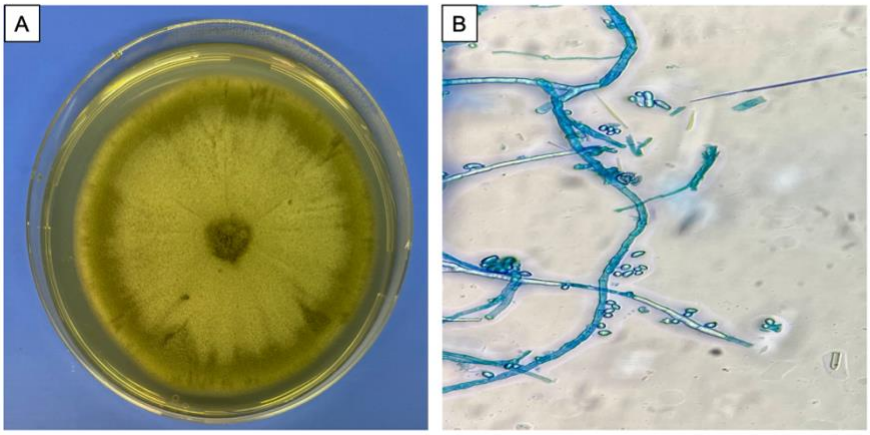


Figura 20. Morfología del Morfotipo 6: A) crecimiento micelial en medio de cultivo APD. B) estructuras somáticas visualizadas al microscopio con objetivo 40X.

Morfotipo 7

Colonia de crecimiento irregular con borde lobulado, de coloración beige, micelio algodonoso de coloración beige, la elevación umbonada presenta una coloración

más cremosa (**Figura 21A**). En las estructuras microscópicas solo se evidenciaron la presencia de hifas largas, hialinas y septadas (**Figura 21B**).

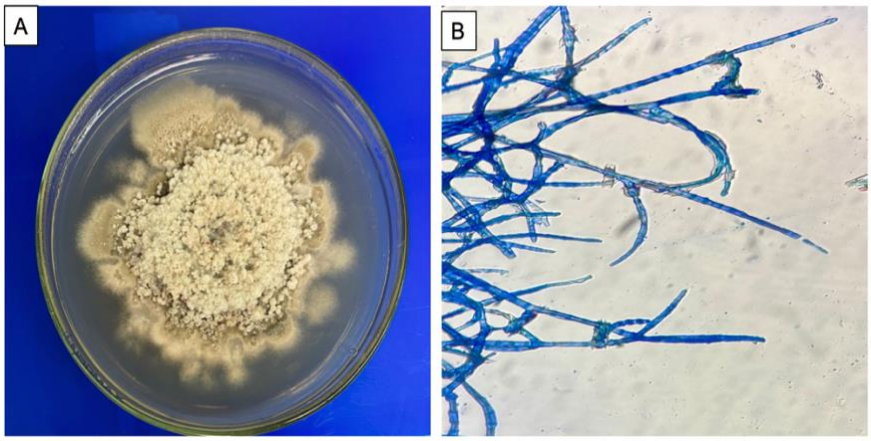


Figura 21. Morfología del Morfotipo 7: A) crecimiento micelial en medio de cultivo APD. B) estructuras somáticas visualizadas al microscopio con objetivo 40X.

Morfotipo 8

Colonia de crecimiento irregular, margen ondulado, elevación de tipo planoconvexa, la coloración a los 7 días fue blanquecina con el pasar de los días esta cambió a verdosa clara (**Figura 22A**). Al analizar las estructuras microscópicas se evidenció un conidióforo y varias conidias dispersas de forma circular (**Figura 22B**).

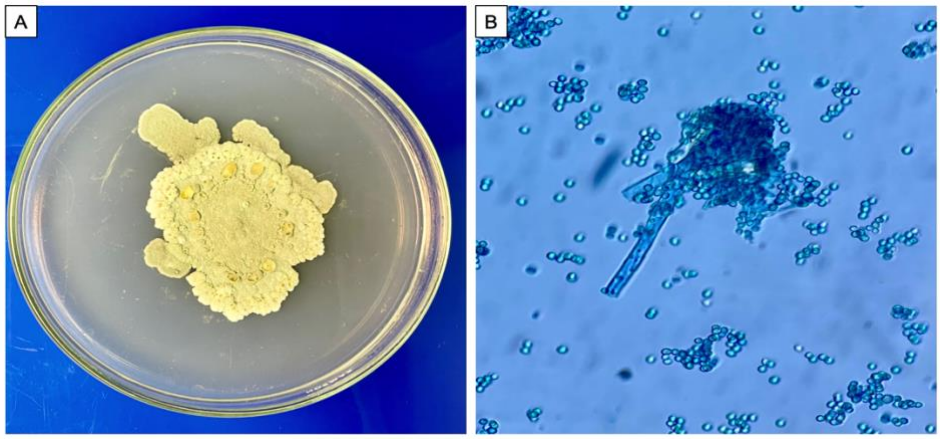


Figura 22. Morfología del Morfotipo 8: A) crecimiento micelial en medio de cultivo APD. B) estructuras somáticas visualizadas al microscopio con objetivo 40X.

Morfotipo 9

Colonia compacta de crecimiento lento, de forma circular y borde entero, coloración verdosa clara, su interior presentó, además, micelio elevado esponjoso de color

blanquecino y se evidenció exudación de coloración amarillenta (**Figura 23A**). Las estructuras microscópicas evidenciaron la presencia de muchas conidias de forma circular e hifas cenocíticas (**Figura 23B**).

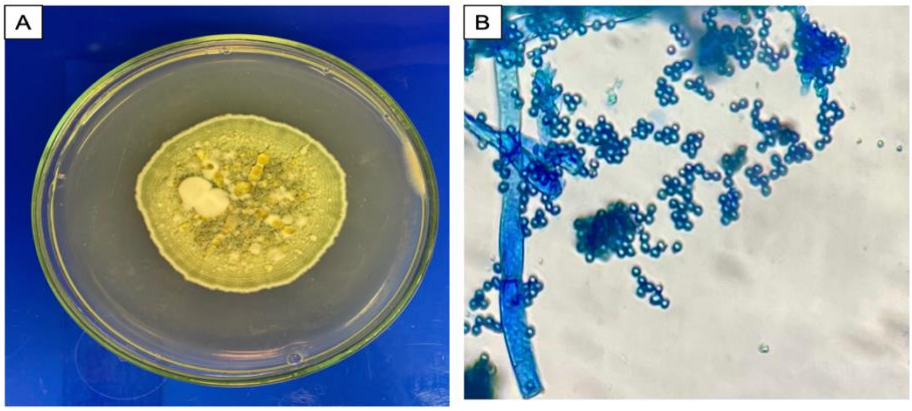


Figura 23. Morfología del Morfotipo 9: A) crecimiento micelial en medio de cultivo APD. B) estructuras somáticas visualizadas al microscopio con objetivo 40X.

Discusión

La morfología del fruto de *Morella pavonis* se distingue por tener un diámetro que varía entre 3,0 y 3,5 mm. Al igual que otras especies pertenecientes al género *Morella* (Moreno, 2014). Los frutos de *Morella pavonis* están cubiertos por gránulos cerosos de coloración blanquecina grisácea. Comparativamente, otras especies del género presentan diferencias marcadas en cuanto a la morfología de sus frutos. Por ejemplo, *M. esculenta* exhibe frutos de 4,0 a 5,0 mm con una variación de color que va desde rojo oscuro hasta rojo negruzco durante la maduración (Shah et al., 2010; Kabra et al., 2019). En el caso de *M. rubra*, la investigación de Gupta (1989) señala un rango de tamaño de frutos entre 12,0 y 15,0 mm, mucho mayor que lo observado en *M. pavonis*. Por su parte, *Morella pubescens* tiene frutos que varían en dimensiones de 3,0 a 5,0 mm y adquieren una coloración negra al alcanzar la madurez (Moreno, 2014).

Existen distintas estructuras en la semilla como la testa o tejidos del fruto que obstaculizan la germinación, inhibiendo el paso de agua y posterior ingreso al embrión (Baskin et al. 2000; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006).

Knevel et al (2002) sugieren que la capa de cera presente en los frutos de *M. cordifolia* inhibe la absorción de agua. No obstante, los resultados obtenidos para *M. pavonis* indican que dicha capa de cera no actúa como un impedimento para la entrada de agua. La prueba de azul de metileno respaldó esta afirmación al demostrar que ninguna estructura del fruto y/o seminal obstaculizan la absorción de agua. El agua atravesó el endocarpio leñoso de *M. pavonis*, aunque de manera lenta, embebiendo el embrión por completo en un lapso de 12 días, de esta forma se descartó presencia de dormancia física.

Además, para respaldar la exclusión de este tipo de dormancia, se observó anatómicamente que la semilla se encuentra rodeada de una testa muy delgada compuesta de una sola capa de células. Es crucial destacar que la función principal del endocarpio leñoso, sería de protección del embrión, posiblemente de predadores de semillas como aves e insectos. Lo anterior se sustenta en el grosor y dureza del endocarpio, así como por la presencia de taninos en las células de los cotiledones. Esto es muy significativo debido a que la testa, al ser muy delgada, no desempeña efectivamente el papel de protección en el ambiente que se encuentra. De acuerdo con Hepp (2020), las capas múltiples de esclereidas en las estructuras del mesocarpio de *Nolana* confieren rigidez y resistencia al fruto. Esta configuración estructural podría contribuir a la preservación de los mericarpos en los bancos de semillas del suelo a lo largo de varios años.

En las semillas de *Morella parvifolia*, se ha observado que el endocarpio, aunque no impide la absorción de agua, ralentiza dicho proceso (Inga, 2017), como fue registrado para *M. pavonis* a través de la prueba de tinción. Inga (2017) al examinar la influencia del endocarpio en la germinación, notó que, esta inició a los 7 días y se registraron niveles elevados de contaminación por patógenos como *Alternaria sp*., *Botrytis cinerea* y *Fusarium sp*. Además, al eliminar el endocarpio se observó una disminución en el porcentaje de germinación, ya que el grupo de control mostró un 66%, mientras que en las semillas donde se extrajo el endocarpio, la germinación fue del 33% (Inga, 2017).

Los ensayos de escarificación con H_2SO_4 a distintos tiempos en el Lote 3 indicaron que la sumersión a 10 minutos elevó la germinación al 25% en comparación con el control (9%) (**Figura 11**). Esto se debería a la acción corrosiva del H_2SO_4 en la lignina del endocarpio, tal como sugerido por Oliveira et al. (2015) para *Eutherpe olaracea*, dado que la aplicación de escarificación ácida mejoró la liberación de glucosa durante la etapa de hidrólisis enzimática (Oliveira et al., 2015). Mayores tiempos de inmersión en Ácido sulfúrico (20 minutos) afectaron negativamente la germinación, sugiriendo daño corrosivo en el embrión.

La viabilidad de semillas de los distintos lotes empleados en este estudio demostró porcentajes elevados, destacando el test de tetrazolio como un potencial indicador crucial para determinar el estado del embrión. Este método, consolidado desde principios del siglo XX y ampliamente utilizado en el control de calidad, se basa en la actividad de diversas enzimas deshidrogenasas. La solución de tetrazolio tiñe los tejidos metabólicamente activos, y la coloración rojiza actúa como indicador de viabilidad al identificar la actividad respiratoria en las mitocondrias de las células de las semillas (França-Neto & Krzyzanowski, 2022). Con la viabilidad confirmada, se pudo avanzar hacia el diseño de varios pretratamientos destinados a superar la dormancia y gatillar la germinación.

El contenido de humedad es un factor importante asociado a la madurez de las semillas y determinante en la viabilidad y longevidad de las semillas tanto ortodoxas como recalcitrantes (Chin et al., 1989).

En el contexto de este estudio, se exploraron los niveles de contenido de humedad en las semillas de *Morella pavonis* y se observó que estas presentan un 22% de humedad inicial.

Comparando estos resultados con investigaciones previas, Shah et al. (2010) establecieron que el contenido de humedad en semillas maduras de *M. esculenta*,

indicador de su madurez fisiológica, se encuentra entre el 30% y 32%. Por otro lado, López et al. (2002) informaron que las semillas maduras de *M. parvifolia* muestran un contenido de humedad del 30%, disminuyendo al 23% después de alcanzar la madurez fisiológica.

El alto porcentaje de germinación en semillas de *M. pavonis* luego de desecadas a bajos de humedad, especialmente en los Lotes 1 y 4 (**Figura 8**), respalda que no hubo daños fisiológicos en la semilla al disminuir el contenido de humedad mediante la desecación en sílica, esto a su vez respaldado por las altos porcentajes de viabilidad obtenidos a través de la prueba de tetrazolio. A pesar de que el test ANOVA no mostró diferencias significativas en el Lote 3, tras la reducción del contenido de humedad, la desecación en sílica se puede deducir como un método efectivo ya que la germinación aumentó del 2% al 9%. Por otra parte, el efecto parece estar asociado al nivel de dormancia, ya que en el Lote 3 el efecto se ve menos pronunciado, mientras que a medida que los lotes eran menos dormantes (Lote 1 y 4), el efecto fue más significativo.

Así mismo, la alta germinación luego de ser desecadas confirman que las semillas de *M. pavonis* son del tipo ortodoxa (sensu Roberts et al. 1973), ya que no perdieron viabilidad luego de ser desecadas a bajos contenido de humedad (7% de contenido de humedad). Algo similar ha sido reportado o sugerido para otras especies de *Morella*. Por ejemplo, Schwintzer & Ostrofsky, (1989) encontraron que semillas secas *Morella gale* permanecen viables luego de 6 años de almacenamiento a 5°C. También, en el caso *M. serrata* cuyas semillas permanecen viables al menos por 1 año almacenadas en bajo condiciones de largo plazo (-20°C, 15% HR.Eq) en el Millennium Seed Bank, Royal Botanic Gardens Kew.

El conocimiento de los requerimientos germinativos ayuda a la perpetuación de la especie. La dormancia es una característica propia que posee cada semilla en donde se impide la germinación aun teniendo todas las condiciones para la misma (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006).

Lo mayores niveles de germinación de las semillas secas en comparación con las semillas frescas (control) sugiere que el proceso de secado puede actuar como un factor desencadenante en la germinación, especialmente en semillas con una dormancia leve o poco profunda. Este efecto también puede entenderse como un posible efecto de la postmaduración (*after- ripening*).

La transición del estado dormante al no dormante de una semilla puede manifestarse de diversas maneras, y una de ellas es mediante la reducción de la hidratación con la exposición a factores de almacenamiento (postmaduración seca). Diversos

estudios indican que este método para romper la dormancia, implica un equilibrio entre el metabolismo, la giberelina y el ácido abscísico, aunque también se postula la posibilidad de que el etileno juegue un papel importante (Iglesias-Fernández et al., 2011).

Además, en semillas ortodoxas las especies reactivas de oxígeno (ROS) están presentes desde la embriogénesis hasta la germinación, las ROS posiblemente actúan como una señal positiva en la liberación de dormancia ya que hay interacción con la vía de transducción del ácido abscísico y giberelinas, controlando así los factores de transcripción y propiedades proteicas a través de la carbonilación (El-Maarouf-Bouteau & Bailly, 2008). En semillas de trigo se observó acumulación de ROS durante la maduración y se ha asociado a la desecación (Pulido et al., 2009).

Los altos porcentajes de germinación de semillas de *M. pavonis* pretratadas con GA_3, especialmente para los Lotes 3 y 4 (**Figura 10**), sumado al relativamente alto porcentajes de germinación en semillas estratificadas en frío (**Figura 9**) indican que *M. pavonis* presenta una dormancia fisiológica del tipo no profunda. Una semilla que posee dormancia fisiológica es permeable al agua y tiene un mecanismo inhibitorio fisiológico que inhibe que la radícula emerja (Baskin & Baskin, 2014). Los resultados revelaron que la estratificación fría tuvo un impacto positivo en la germinación de los Lotes 1 y 2, elevando las tasas al 28% y 33%, respectivamente (**Figura 9**). Este hallazgo es consistente con investigaciones anteriores en *Morella faya*, donde la estratificación fría durante dos meses demostró mejorar significativamente la germinación de las semillas, aumentando la germinación de 1,6% al 75,8% (Pipinis et al., 2016).

El uso de GA_3 a 500 ppm es otro tratamiento que ayudó a definir el tipo de dormancia, ya que semillas del Lote 3 con germinación inicial del 2% elevaron la germinación al 78,3%, del mismo modo este método resultó eficiente en semillas del Lote 4 (**Figura 10**). López et al., (2002) expuso semillas de *M. parvifolia* a distintas concentraciones de GA_3 y demostró que la germinación incrementó al elevar la concentración de GA_3 a valores de 2000 ppm al (97% germinación), aunque a 500 ppm y control los valores también fueron elevados, con 93% y 91% de germinación, respectivamente. Chen et al (2008) revelaron que el endocarpio de semillas de *M. rubra* contiene una gran cantidad de ABA y señalan que la aplicación de GA_3 a 1.730 ppm promueven la germinación. En *Arabidopsis thaliana* se explica que las giberelinas tienen un estímulo directo para promover el crecimiento del embrión (Karssen & Laçka, 1986), además varios autores indicaron que el GA_3 ha sido el más eficiente para romper dormancia (Baskin & Baskin, 2014).

La variación en la germinación de cada lote fue evidente, tanto para la condición control, como en la respuesta frente a GA_3 como la estratificación fría, sugiriendo diferencias en los niveles de dormancia de semillas entre poblaciones de *M. pavonis*, El Lote 4 mostró ser el menos dormante, llegando a alcanzar el 43% en el control, valor que en otros lotes no se alcanzó ni siquiera aplicando distintos periodos de estratificación como es el caso de los Lotes 1 y 2, cuya germinación control alcanzó solo un 18,3% y 4,1%, respectivamente. El análisis estadístico evidenció que existen diferencias significativas ($p<0,05$) entre lotes (**ANEXO 1**). El porcentaje de germinación control del Lote 3 se reveló como muy baja, registrando un porcentaje del 2%.

Semillas de algunas especies requieren incubación en temperatura alternante, para romper la dormancia y gatillar la germinación (Baskin & Baskin, 2004). Según Chen et al. (2008) en semillas de *M. rubra* la estratificación cálida (30/20 °C) durante 8 semanas +12 semanas de estratificación en frío (4°C) elevó la germinación de las semillas al 67% ya que estas inicialmente germinaron 31%. Del mismo modo Chien et al (2000) sugiere que las semillas de *M. adenophora* y *M. rubra* requieren de una estratificación cálida seguida de una estratificación fría para superar el estado de dormancia, no obstante, en este estudio se observó que este tipo de tratamiento no resultó útil debido a que la germinación decreció a porcentajes muy bajos en comparación con el control (**Figura 9**).

El estado de dormancia se ve influenciado por el ambiente materno en el que la semilla desarrolla y madura pero también por el ambiente externo cuando esta se dispersa, existiendo cambios de dormancia con el tiempo (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). En este estudio se usaron semillas provenientes de 4 diferentes localidades, el Lote 4 es el que presentó mejor comportamiento, inclusive la variación de germinación con el tiempo fue evidente, iniciando la germinación en 43,3% y llegando a alcanzar el 71% en tan solo un mes sin la aplicación de un tratamiento previo y esta aumentó con la aplicación de temperaturas alternas (30/20 °C) lo que nos ayudó a demostrar que, además, esta temperatura resultó ser eficiente. Contrariamente, la temperatura 20/10 °C, en semillas sembradas el mismo mes redujeron la germinación al 60% (**ANEXO 2**).

Los datos proporcionados por el INIA indican que las semillas de este lote provienen de la localidad de Chironta, Km 20 del Lluta, estudios geográficos del Valle del Lluta señalan que la secuencia de farellón costero- depresión intermedia- planos inclinados- planicies prealtiplánicas- Cordillera de los Andes genera una distribución de franjas escalonadas longitudinales. Los farellones costeros con una altitud media

de 1000 msnm ejercen una barrera de la humedad costera, de este modo se muestran diferencias en la evaporación, precipitación y humedad relativa (IGM, 1985). A partir de los 1000 msnm existe la presencia de un clima desértico frío que posee una baja humedad relativa y escasas precipitaciones (SpA, 2021), en *M. esculenta* se determinó que semillas con un rango de distribución baja maduran tempranamente debido a que la temperatura es más alta (Shah et al., 2010), de esta forma si relacionamos temas antes mencionados como la maduración, desecación y disminución del contenido de humedad se podría explicar porque el Lote 4 fue el menos dormante.

En lo que respecta a las semillas provenientes de los Lotes 1, 2 y 3 se determinó que estas proceden de la provincia de Tamarugal, el desierto del Tamarugal es denominado también bosque claro xeromórfico (Quintanilla, 1988), existen sitios en donde hay acumulación de agua subterránea es por ello que varios árboles espinosos se han adaptado debido a la influencia de los aluviones desde la cordillera (Gajardo,1997), además esta descripción podría explicar el alto contenido de humedad de las semillas de *Morella pavonis*.

Las posibles variaciones en las condiciones climáticas y geográficas de cada localidad de la cual provienen las semillas podrían sugerir diferencias en los patrones de dormancia entre los diversos lotes. En similar sentido, estas características podrían estar asociadas con las fluctuaciones observadas en la presencia de hongos endófitos aislados en las semillas de los Lotes 3 y 4 de *M. pavonis*, no obstante, determinar los distintos patrones de diversidad de endófitos es complejo ya que varios se originan por la interacción de factores ecológicos, históricos y contemporáneos (Harrington et al., 2019).

La diversidad alfa estimada en este estudio para hongos endófitos en semillas de *M. pavonis*, fue mayor en Lote 4, en comparación con el Lote 3. Según Arnold & Engelbrecht (2007) se muestra que la biodiversidad de hongos endófitos aislados en tejido foliar sigue un gradiente latitudinal, presentando mayor diversidad en latitudes más bajas, este patrón podría explicar la diferencia de la diversidad entre lotes y aparición de distintos morfotipos debido a que la latitud en el Lote 4 fue 18° 19' 40.980" S y la latitud del Lote fue 3 20° 4' 31.908" S. Aunque, esto último debe ser evaluados en posteriores investigaciones. Es importante recalcar que aunque algunos de los hongos endófitos se transmiten verticalmente, la variación en cuanto a diversidad se debe al tejido que se use para el aislamiento y además el área dentro del follaje, ya que existe diferencia inclusive dentro del microhábitat foliar, si se usa toda la hoja o solo una sección (Harrison & Griffin, 2020). Coelho (2017) en un

estudio de aislamiento de hongos endófitos en *Urena Lobata* encontró que la colonización de endófitos es mayor en hojas que semillas, identificando 28 morfotipos aislados en semillas, mientras que 47 morfotipos fueron aislados en hojas (Coelho, 2017).

Los endófitos pueden abarcar mutualistas que benefician la salud de la planta huésped, patógenos latentes que pueden o no manifestar síntomas de enfermedad en algún momento, o saprófitos que permanecen inactivos hasta que se produce la senescencia del tejido (Kleczewski et al., 2012). En la naturaleza, las plantas interactúan de manera simbiótica con endófitos mutualistas para protección de distintos tipos de estrés y además ayudan a promover el crecimiento (Trivedi et al., 2020). Los hongos endófitos que ejercen un rol endosimbionte en las semillas, son importantes en el crecimiento y desarrollo de las semillas (Yan et al., 2022). El estudio mostró la presencia de hongos endófitos con mayor abundancia relativa y diversidad en semillas del Lote 4. Este mismo lote de semillas, presentó el mayor porcentaje de germinación, lo que sugiere que la mayor abundancia y diversidad de hongos endófitos podría tener un rol positivo en la germinación de semillas de *M. pavonis*. Según Shearin et al. (2018) en semillas de *Phragmites australis* donde se aislaron endófitos, la germinación fue mayor (36%) que en las semillas en donde no se aisló ningún endófito (20%). Además, reportaron que la presencia de *Penicillium spp.* estuvo asociada a la mayor tasa germinativa de semillas de uno de los sitios estudiados. Aunque en nuestro estudio no se llegó a identificar molecularmente los morfotipos, las características macroscópicas y microscópicas de ciertos morfotipos especulan que podría tratarse de *Penicillium*, esta es otra de las razones que podría explicar la eficaz germinación del Lote 4. Es importante señalar que no todos los *Penicillium spp.* actúan de manera mutualista, existen patógenos fúngicos que causan moho como es el caso de *P. digitatum, P. italicum y P. citrinum* (Al-Sheikh & Yehia, 2016). No obstante, se han reportado diversos estudios que muestran que los *Penicillium spp.* endófitos tienen un rol mutualista. Según Khan et al. (2011) el endófito *Penicillium funiculosum* mejoró el crecimiento de la planta de Waito-C, un cultivar de arroz mutante. Aunque especulamos que los endófitos aislados en el Lote 4 podrían tratarse de agentes mutualistas debido a que se asocia la alta tasa de germinación con su presencia, es importante poner en práctica distintas pruebas como ensayos de antagonismo y/o inoculación en semillas para evaluar su verdadero efecto.

Finalmente, la información recopilada en este estudio contribuye no solo al ámbito científico sino también a la comunidad en general. El estado de conservación

Vulnerable en que se encuentra de *Morella pavonis* resalta la necesidad de controlar la intervención antropogénica con el propósito de preservar y perpetuar la especie. El conocimiento de los requerimientos para la germinación son el inicio del camino para conservar esta especie nativa, tanto de forma *in situ* como *ex situ*.

Además, es crucial llevar a cabo nuevos estudios que aborden diversos aspectos relacionados con el uso de frutos, semillas y otros órganos de la planta, ya que en el género *Morella* se han documentado varios usos con relevancia ecológica, medicinal e industrial.

Conclusiones

El análisis morfológico y anatómico de la semilla de *M. pavonis* sirvieron para descartar la presencia de diferentes tipos de dormancia como física, morfológica, morfofisiológica y combinada. Se observó que el endocarpio duro a pesar de estar formando por esclereidas no restringe la absorción del agua por las semillas, aunque la imbibición es lenta ésta logra el ingreso en 12 días y al transcurrir aproximadamente 3 o 4 días más en semillas no dormantes, el endocarpio se parte en dos y ocurre la aparición de la radícula.

Dada la respuesta positiva a tratamientos de desecación, estratificación fría y uso de GA_3, se puede concluir que la dormancia que poseen las semillas de *Morella pavonis* corresponde a dormancia fisiológica nivel no profundo.

Se evidenció la presencia de 9 morfotipos de hongos endófitos aislados a partir de semillas de *M. pavonis*, que exhibe diferencia en la diversidad en los Lotes 3 y 4, estaría estrechamente ligada a la variación de germinación en ambos Lotes, pero también esta diferencia de morfotipos varía de acuerdo a la latitud en la que se colectaron las semillas, existiendo más diversidad en el sitio con menor latitud, es decir semillas del Lote 4 provenientes de Chironta, Km 20 del Lluta.

Resumen

Morella pavonis es una especie nativa distribuida en el sur de Perú y en el norte de Chile, comúnmente conocida como pacama, denominada en la categoría de vulnerable. Existe escasa información sobre la germinación de semillas y hongos endófitos asociados en *M. pavonis*. Generar este conocimiento aportaría a desarrollar estrategias para ayudar a la preservación de esta especie. Se recolectaron frutos en cuatro localidades (Lotes) de las provincias de Arica y Tamarugal, el estudio de la morfología del fruto indicó que se compone por un endocarpio duro rodeado de cera que no inhibe el ingreso de agua, en su interior se encuentra una semilla exalbuminada, con un contenido de humedad del 22%, el test de tetrazolio evidenció la alta viabilidad en todos los lotes (75-88%). La máxima germinación se obtuvo en el Lote 4 alcanzando el 87% por la reducción del contenido de humedad, el segundo método más efectivo fue el uso de GA_3 500 ppm maximizando la germinación ineficiente elevándola del 2% al 78% en el Lote 3, la estratificación fría a 4 °C incrementó la germinación en los Lotes 1 y 2 con valores finales del 28 y 33%, respectivamente, información que sugiere la existencia de dormancia fisiológica no profunda.

Las semillas de *Morella pavonis,* además, revelaron albergar hongos endófitos, se encontró la presencia de 9 morfotipos presentes en los Lotes 3 y 4, la diversidad alfa mostró índices mayores en el Lote 4, casualmente semillas de este lote alcanzaron la máxima germinación.

Palabras clave: germinación, dormancia fisiológica, morfotipos.

Referencias

Albornoz L., P. 2010. Histo-NOA. Técnicas histológicas vegetal. : 20. http://histonoa.csnat.unt.edu.ar/pdf/Técnicas_histológicas_vegetal_Histo-NOA.pdf.Albornoz L., P. 2010. Histo-NOA. Técnicas histológicas vegetal. : 20. http://histonoa.csnat.unt.edu.ar/pdf/Técnicas_histológicas_vegetal_Histo-NOA.pdf.

Al-Sheikh, H., & R.S. Yehia. 2016. In vitro antifungal efficacy of Aspergillus niger ATCC 9642 chitosan-AgNPs composite against post-harvest disease of citrus fruits. Appl. Biochem. Microbiol. 52(4): 413–420. doi: 10.1134/S0003683816040177.

Arnold, A.E., & B.M.J. Engelbrecht. 2007. Fungal endophytes nearly double minimum leaf conductance in seedlings of a neotropical tree species. J. Trop. Ecol. 23(3): 369–372. doi: 10.1017/S0266467407004038.

Bahamondes, D., P. Moraga, & E. Belmonte. 2021. Volumen 39, Nº 1. Páginas 119-125 IDESIA (Chile) Marzo. : 2021.

Bao, G., M. Song, Y. Wang, K. Saikkonen, & H. Wang. 2019. Interactive effects of Epichloë fungal and host origins on the seed germination of Achnatherum inebrians. Symbiosis 79(1): 49–58. doi: 10.1007/s13199-019-00636-0.

Bhatt, I.D., R. Rawal, and U. Dhar. 2000. Improvement in seed germination of Myrica esculenta Buch . - Ham . ex D . Don - A high value tree species of Kumaun Himalaya , India. Seed Sci. Technol. 28(3): 597–605.

Benoit, I. 1989. Libro Rojo de la Flora Terrestre de Chile. Santiago de Chile. p. 157

Cao, R., X. Liu, K. Gao, K. Mendgen, Z. Kang, et al. 2009. Mycoparasitism of Endophytic Fungi Isolated From Reed on Soilborne Phytopathogenic Fungi and Production of Cell Wall-Degrading Enzymes In Vitro. Curr. Microbiol. 59(6): 584–592. doi: 10.1007/s00284-009-9477-9.

Chen, S., S. Kuo, & C. Chien. 2008. Roles of gibberellins and abscisic acid in dormancy and germination of red bayberry (Myrica rubra) seeds Roles of gibberellins and abscisic acid in dormancy and germination of red bayberry (Myrica rubra) seeds. Tree Physiol. 28(9): 1431–1439. doi: 10.1093/treephys/28.9.1431.

Chen, Y., K. Su, C. Li, & J.F. White. 2021. Interactive effects of epichloë endophyte, dormancy-breaking treatments and geographic origin on seed germination of achnatherum inebrians. Microorganisms 9(11). doi: 10.3390/microorganisms9112183.

Chien, C., C. Shung-Ying, C. Yu-Cheng, & H. Kung-Yung. 2000. Dormancy-realasing Strategies for Myrica Seeds. Taiwan J. For. Sci. 15(4): 473–481.

Chin, H.F., B. Krishnapillay, & P.C. Stanwood. 1989. Seed moisture: Recalcitrant vs. orthodox seeds. Seed Moisture. p. 15–22

Clay, K., & C. Schardl. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. Am. Nat. 160(4 SUPPL.). doi: 10.1086/342161.

Coelho, C.F. 2017. Isolamento e identificação de fungos endofíticos da malva.

Donoso, C. 1993. Bosques Templados de Chile y Argentina. Variación, Estructura y Dinámica. Editorial Universitaria, Santiago de Chile. 483 pp.

El-Maarouf-Bouteau, H., & C. Bailly. 2008. Oxidative signaling in seed germination and dormancy. Plant Signal. Behav. 3(3): 175–182. doi: 10.4161/psb.3.3.5539.

Finch-Savage, W.E., & G. Leubner-Metzger. 2006. Seed dormancy and the control of germination. New Phytol. 171(3): 501–523. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x.

Fordham, A.J. 1983. Of birds and bayberries: seed dispersal and propagation of three Myrica species. Ardnoldia 43(4): 20–23. http://www.science.fau.edu/biology/gawliklab/papers/FordhamAJ1983.pdf.

França-Neto, J. de B., & F.C. Krzyzanowski. 2022. Use of the tetrazolium test for estimating the physiological quality of seeds. Seed Sci. Technol. 50(2): 31–44. doi: 10.15258/sst.2022.50.1.s.03.

Harrington, A.H., M. Del Olmo-Ruiz, J.M. U'Ren, K. Garcia, D. Pignatta, et al. 2019. Coniochaeta endophytica sp. nov., a foliar endophyte associated with healthy photosynthetic tissue of Platycladus orientalis (Cupressaceae). Plant Fungal Syst. 64(1): 65–79. doi: 10.2478/pfs-2019-0008.

Harrison, J.G., & E.A. Griffin. 2020. The diversity and distribution of endophytes across biomes, plant phylogeny and host tissues: how far have we come and where do we go from here? Environ. Microbiol. 22(6): 2107–2123. doi: 10.1111/1462-2920.14968.

Hartmann, H. & Kester, D. 1977. Propagación de plantas. Principios y Prácticas. Continental. México. 810 pp.

Hartmann, H. & Kester, D. 1988. Propagación de Plantas. México D.F. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V. 760 pp. Kemp, 1975

Hepp, J. 2019. Characterization of seed dormancy of Nolana (Solanaceae) in the coastal Atacama desert of Chile. Doctoral thesis, available at https://repositorio.uc.cl/handle/11534/26359

Iglesias-Fernández, R., M. Del Carmen Rodrguez-Gacio, & A.J. Matilla. 2011. Progress in research on dry afterripening. Seed Sci. Res. 21(2): 69–80. doi: 10.1017/S096025851000036X.

Inga, Z.D. 2017. Ecología de germinación de Morella sp., enfocada a la propagación y restauración de ecosistemas. https://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/6656/1/12676.pdf.

Kabra, A., N. Martins, R. Sharma, R. Kabra, & U.S. Baghel. 2019. Myrica esculenta Buch.-Ham. ex D. Don: A natural source for health promotion and disease preventdion. Plants 8(6): 1–21. doi: 10.3390/plants8060149.

Karssen, C.M., & E. Laçka. 1986. A Revision of the Hormone Balance Theory of Seed Dormancy: Studies on Gibberellin and/or Abscisic Acid-Deficient Mutants of Arabidopsis thaliana. 1985: 315–323. doi: 10.1007/978-3-642-71018-6_41.

Khan, A.L., M. Hamayun, Y.H. Kim, S.M. Kang, & I.J. Lee. 2011. Ameliorative symbiosis of endophyte (Penicillium funiculosum LHL06) under salt stress elevated plant growth of Glycine max L. Plant Physiol. Biochem. 49(8): 852–861. doi: 10.1016/j.plaphy.2011.03.005.

Kleczewski, N.M., J.T. Bauer, J.D. Bever, K. Clay, & H.L. Reynolds. 2012. A survey of endophytic fungi of switchgrass (Panicum virgatum) in the Midwest, and their putative roles in plant growth. Fungal Ecol. 5(5): 521–529. doi: 10.1016/j.funeco.2011.12.006.

Knevel, I.C., H.G. Venema, & R.A. Lubke. 2002. The search for indigenous dune stabilizers: Germination requirements of selected South African species. J. Coast. Conserv. 8(2): 169–178. doi: 10.1652/1400-0350(2002)008[0169:TSFIDS]2.0.CO;2.

Kumari, Y., D.. Sharma, and M.. Reddy. 2015. Effect of seed treatments on germination behavior of myrica Negi thumb : an important mpt of Himalayan region Scanned by CamScanner. Indian For. 141(4): 475–476.

Lin, X., C. Lu, Y. Huang, Z. Zheng, W. Su, et al. 2007. Endophytic fungi from a pharmaceutical plant, Camptotheca acuminata: Isolation, identification and bioactivity. World J. Microbiol. Biotechnol. 23: 1037–1040. doi: 10.1007/s11274-006-9329-8.

López, B., J. Enríquez, & F. Petuz. 2002. Respuesta de las semillas de Myrica parvifolia a la acción pregerminativa de la giberelina. Colomb. For. 7(15): 63–67.

Luebert, F. 2004. Apuntes sobre la vegetación de bosque y matorral del desierto precordillerano de Tarapacá (Chile). Chloris Chil. 7(1): 28–39. https://www.chlorischile.cl/.

Lutzow-Felling, C., & D. Gardner. 1995. Myrica faya: review of the biology, ecology, distribution, and control, including an annotated bibliography. Tech. Rep. 94(April): 115. http://scholarspace.manoa.hawaii.edu/handle/10125/7257.

Magalhães, S., W. Carlos, V. Missagia, F. Costa, F. Antonio, et al. 2008. DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM CANDEIA Eremanthus erythropappus (DC.) MacLeish26. Cerne 14(3): 267–273.

Moreno, M. 2014. Vegetación Árborea Del Campus (Puj). https://www.javeriana.edu.co/documents/16101/4318124/Catalogo_flores_campus.pdf/8b7e3b1f-fa75-4622-9c7b-c9dff8d91a4a.

Nii, N., H. Iwata, T. Astha, & Y. Nakao. 2008. The morphology of red bayberry (Myrica rubra Sieb. et Zucc.) during fruit development. J. Hortic. Sci. Biotechnol. 83(2): 154–159. doi: 10.1080/14620316.2008.11512363.

Oliveira, J.A.R., L.H.S. Martins, A. Komesu, & R. Maciel Filho. 2015. Evaluation of alkaline delignification (NaOH) of Açaí seeds (eutherpe oleracea) treated with H2so4 dilute and effect on enzymatic hydrolysis. Chem. Eng. Trans. 43: 499–504. doi: 10.3303/CET1543084.

Parra, C. 2002. New combinations in South American Myricaceae. 54(April): 322–326. https://sci-hub.se/https://bioone.org/journals/Brittonia/volume-54/issue-4/0007-196X(2003)54[322:NCISAM]2.0.CO;2/New-combinations-in-South-American-Myricaceae/10.1663/0007-196X(2003)54[322:NCISAM]2.0.CO;2.short.

Parra Rivero, S.M., N. Maciel-De Sousa, M. Sanabria-Chopite, & R. Valera. 2020. Dormancia física de la semilla de Peltophorum pterocarpum (DC.) Backer ex Heyne: estudio morfoanatómico, germinación y emergencia de la plántula. Rev. Bases la Ciencia. e-ISSN 2588-0764 5(3): 73. doi: 10.33936/rev_bas_de_la_ciencia.v5i3.2489.

Petrini, O. 1991. Fungal Endophytes of Tree Leaves. p. 179–197

Petrini, O., T.N. Sieber, L. Toti, & O. Viret. 1992. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. Nat. Toxins 1(3): 185–196. doi: 10.1002/nt.2620010306.

Pipinis, E., E. Milios, K. Kitikidou, & K. Radoglou. 2016. Treatments for seed germination improvement in Prunus azorica, Frangula azorica and Morella faya, three native species of Azores Islands. Bot. Lett. 163(3): 329–335. doi: 10.1080/23818107.2016.1206035.

Place, A., & E. Stiles. 1992. Living off the wax of the land: bayberries and yellow-rumped warblers. Auk 109(2): 334–345.

Pulido, P., F. Domínguez, & F.J. Cejudo. 2009. A hydrogen peroxide detoxification system in the nucleus of wheat seed cells: Protection or signaling role? Plant Signal. Behav. 4(1): 23–25. doi: 10.4161/psb.4.1.7221.

Shah, S., A. Tewari, B. Tewari, & R.P. Singh. 2010. Seed maturity indicators in Myrica esculenta, Buch-Ham. Ex. D.Don.: A multipurpose tree species of subtropical-temperate Himalayan region. New For. 40(1): 9–18. doi: 10.1007/s11056-009-9179-y.

Shearin, Z.R.C., M. Filipek, R. Desai, W.A. Bickford, K.P. Kowalski, et al. 2018. Fungal endophytes from seeds of invasive, non-native Phragmites australis and their potential role in germination and seedling growth. Plant Soil 422(1–2): 183–194. doi: 10.1007/s11104-017-3241-x.

Simpson, J.P., & J.B. Ohlrogge. 2016. A novel pathway for triacylglycerol biosynthesis is responsible for the accumulation of massive quantities of glycerolipids in the surface wax of bayberry (Myrica pensylvanica) fruit. Plant Cell 28(1): 248–264. doi: 10.1105/tpc.15.00900.

SpA, I. 2021. Plan Estratégico de Gestión Hídrica en la Cuenca del Río Lluta.

Strobel, D., A.M. Mitchell, E. Moore, R. Robison, & J. Sears. 2001. Volatile antimicrobials from Muscodor crispans, a novel endophytic fungus. Microbiology 156(1): 270–277. doi: 10.1099/mic.0.032540-0.

Schwintzer, C. R., & Ostrofsky, A. 1989. Factors affecting germination of Myrica gale seeds. Canadian Journal of Forest Research, 19(9), 1105-1109. doi: https://cdnsciencepub.com/doi/abs/10.1139/x89-167

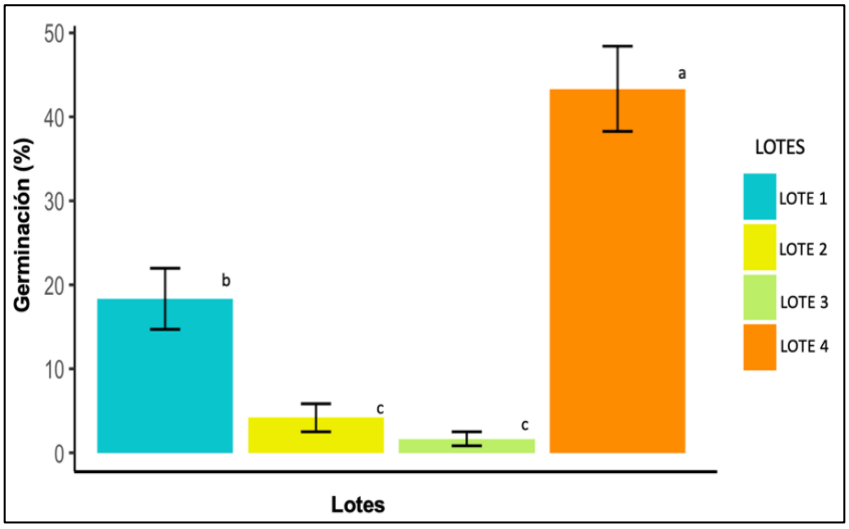
Trivedi, P., J.E. Leach, S.G. Tringe, T. Sa, & B.K. Singh. 2020. Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. Nat. Rev. Microbiol. 18(11): 607–621. doi: 10.1038/s41579-020-0412-1.

Yan, K., Z. Pei, L. Meng, Y. Zheng, L. Wang, et al. 2022. Determination of Community Structure and Diversity of Seed-Vectored Endophytic Fungi in Alpinia zerumbet. Front. Microbiol. 13(February): 1–11. doi: 10.3389/fmicb.2022.814864.

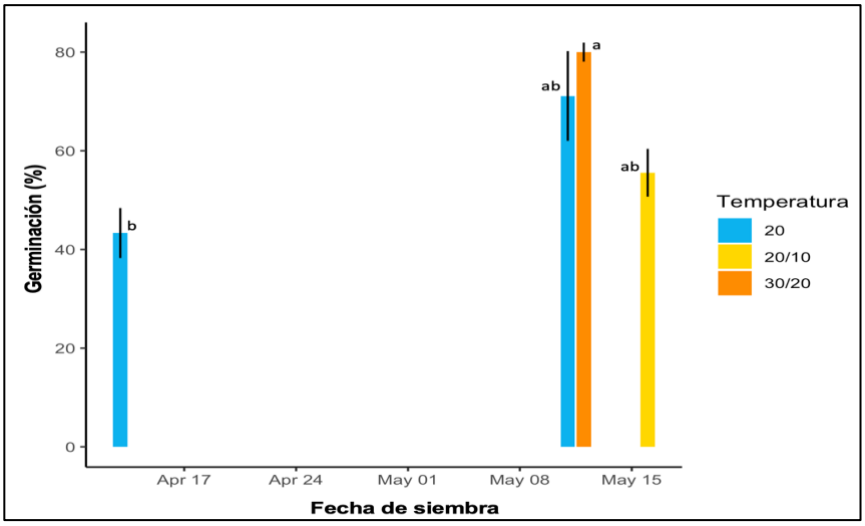
Yanthan, M., & A.K. Misra. 2013. Molecular approach to the classification of medicinally important actinorhizal genus Myrica. Indian J. Biotechnol. 12(1): 133–136.

Zhang, D.X., P. Nagabhyru, & C.L. Schardl. 2009. Regulation of a chemical defense against herbivory produced by symbiotic fungi in grass plants 1,2w[OA]. Plant Physiol. doi: 10.1104/pp.109.138222.

Anexos



ANEXO 1. Germinación control de los 4 Lotes en estudio. Medias con las mismas letras son estadísticamente iguales.



ANEXO 2. Cambios en la germinación a través del tiempo y bajo distintas temperaturas del Lote 4. Medias con las mismas letras son estadísticamente iguales.